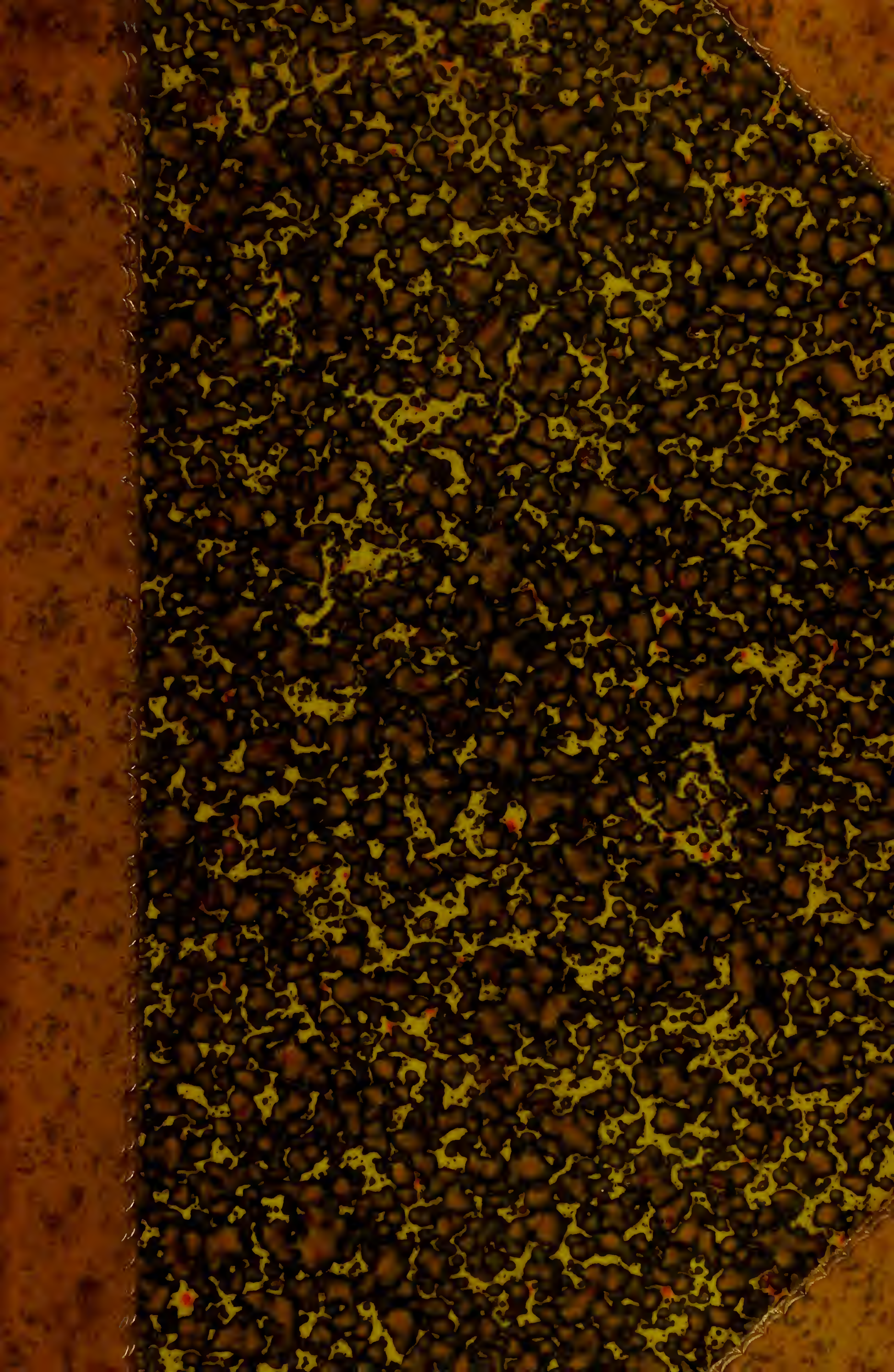


Prof. Dott. G. SANARELLI
DIRETTORE DELL'ISTITUTO D'IGIENE SPERIMENTALE
DELL'UNIVERSITÀ DI MONTEVIDEO

ETIOLOGIA E PATOGENESI

DELLA

FEBBRE GIALLA

(con XII tavole)





TORINO
ROSENBERG & SELLIER
LIBRERIA INTERNAZIONALE
Via Bogino, 3

1897.



INDICE

Parte Prima.

Parte Seconda.

Parte Terza.

PARTE PRIMA.

I.

Riassunto delle nostre attuali conoscenze sulla etiologia e patogenesi della febbre gialla. (1)

La febbre gialla è una malattia riconosciuta da molto tempo di natura indubbiamente specifica, ma intorno a cui le nostre conoscenze etiologiche e patogeniche si sono arrestate, sin' ora, ai risultati di investigazioni scientifiche insufficienti. La estrema povertà di tali conoscenze non è certo dovuta alla mancanza di notevoli contribuzioni scientifiche.

La letteratura riguardante la febbre gialla occupa infatti un posto già ragguardevole nella patologia medica dei paesi caldi.

Malgrado ciò, essa non ha potuto giammai varcare nè interpretare in maniera soddisfacente le più modeste osservazioni della clinica, dell'anatomia patologica e della epidemiologia.

Ciò è dovuto a varie cause che sono forse rappresentate principalmente: 1° dalla sintomatologia oltremodo oscura, complessa e proteiforme del quadro morboso; 2° dal risultato infruttuoso dei

---

(1) Sinonimia: *typhus icterodes* (lat.), *typhus amaril* (franc.), *fiebre amarilla*, *vomito negro* (spag.), *febre amarella* (port.).

molteplici tentativi fatti da vari autori allo scopo di ricercarne e studiarne l'agente specifico.

Per ciò che si riferisce al quadro clinico la febbre gialla costituisce un insieme di sintomi svariatissimi che si accompagnano più o meno regolarmente e possono compendiarsi nel seguente tipo nosologico comune, che ordinariamente si divide in tre periodi.

1° Periodo. — Dopo un'incubazione, che si crede di poter stabilire entro 2 a 4 giorni, appaiono i primi sintomi, che generalmente sono improvvisi e violenti. L'ammalato, d'ordinario durante il sonno, è assalito da un brivido più o meno intenso, seguìto da una rapida elevazione della temperatura (40°-41° C).

Altre volte però precedono dei sintomi che non hanno niente di caratteristico e rientrano nei segni comuni delle gravi malattie infettive acute: cefalea, dolore intraorbitale, stanchezza generale, dolori muscolari, dolore epigastrico, nausea, vomito e soprattutto rachialgia intensa.

In poche ore l'aspetto generale del paziente si fa gravissimo: la pelle talora è secca, tal'altra è ricoperta di sudore, la faccia si inietta, gli occhi si arrossano, le pupille si dilatano e lo sguardo diviene brillante e spaventato come quello di un ubriaco.

Si manifesta insonnia penosa e un'agitazione indefinibile, angosciosa, persistente, accompagnata sempre da una spasmodica rachialgia — il *coup de barre* degli autori francesi — e da una oppressione epigastrica così molesta, che getta l'ammalato in un estremo abbattimento fisico e morale.

Una intolleranza gastrica ostinata, accompagnata sempre da nausee e da sete ardente, precede di poco i disordini delle funzioni digestive che si manifestano dapprima con vomiti alimentari, quindi mucosi ed infine biliosi. Di rado si manifesta la diarrea e la costipazione è la regola. Tuttavia la lingua è impatinata, arrossata ai margini, le gengive si tumefanno e sanguinano, la mucosa del palato molle e del faringe è congesta e infiammata. Le urine si fanno scarse, molto colorate e leggermente albuminose.

Tutti questi sintomi persistono e si aggravano nei primi due o tre giorni, durante i quali la temperatura raggiunge il suo massimo che è di 40°-41°, presentando debolissime remissioni.

A questo punto appare d'ordinario l'ittero ed il così detto *vomito nero* che è dovuto alle frequenti emorragie gastriche.

2° *Periodo.* — Circa al quarto giorno si verifica nello stato dell'ammalato un sorprendente cambiamento di tutti i sintomi.

La febbre cessa, la cefalalgia, la rachialgia e le mialgie scompaiono insieme alla sete ed alla congestione delle mucose e della cute, che ridiventa morbida e fresca.

Il paziente prova una sensazione subiettiva di benessere insolito, riacquista un umor gaio e la fiducia di una prossima guarigione. Però la caratteristica sensibilità epigastrica ed il vomito non iscompaiono del tutto, così se l'ammalato, dopo questo stadio di remissioni che può avere la durata di poche ore sino a due giorni, non entra risolutamente in convalescenza, sussegue il

3° *Periodo.* — È caratterizzato, in generale, dall'ascensione della temperatura e da un rapido peggioramento di tutti i sintomi. Allora la sensibilità gastrica ed il vomito si riacerbano, l'itterizia si fa più intensa, il polso è filiforme e la cute diviene sede di traspirazioni oltremodo fetide.

L'ammalato cade in preda ad un profondo abbattimento che lo rende incosciente, la faccia si sfigura, incessanti emorragie si manifestano dal naso, dagli intestini, dalle orecchie, dalle congiuntive, dagli organi genitali, ecc.; la bocca diviene sede d'una stomatite intensa e si annuncia l'anuria accompagnata da orribili dolori lombari.

Frattanto i vomiti di sangue esauriscono il paziente, il quale ben presto cade in preda al delirio, che precede un crescente ed irreparabile collasso, specialmente caratterizzato dall'abbassarsi della temperatura e dall'impiccolimento del polso.

Infine sopraggiunge il singhiozzo, il vomito diviene quasi continuo, l'ammalato cade in sopore e muore in coma o in convulsioni fra il 5° od il 7° giorno di malattia, presentando un quadro finale dei più raccapriccianti.

Questo, presso a poco, è il tipo clinico ordinario della febbre gialla, però come avviene in tutte le malattie infettive, questo tipo è suscettibile di così infinite variazioni e di così svariate complicazioni per cui può dirsi che le febbre gialla non è mai identica a sè stessa.

Le *eccezioni* più frequenti e meritevoli di essere segnalate, per la migliore intelligenza di alcuni fatti che andremo studiando in appresso, sono le seguenti: 1° non è possibile stabilire un tipo ter-

mico *specifico* della febbre gialla, perchè esso varia con una frequenza superiore a quella del tipo termico considerato come normale; 2° l'ittero può manifestarsi sin da principio; come può comparire a convalescenza inoltrata; 3° il vomito può essere precoce o tardivo, e invece di diventare emorragico, può rimanere bilioso durante tutta la malattia; 4° la morte, invece di verificarsi fra il 5° ed il 6° giorno, può sopravvenire anche dopo 48 ore (forme fulminanti), come può ritardare sino al 10° o 12° giorno.

Le *complicazioni* più note che sopraggiungono nel corso della febbre gialla sono: la dissenteria, le parotiti, ascessi ed eruzioni furuncolose che compaiono per lo più verso l'ultimo periodo della malattia od al principio della convalescenza.

Le *ricadute* sono sempre gravi e possono manifestarsi in epoche le più lontane dall'inizio della convalescenza. Io ho osservato un caso, nel quale la ricaduta si produsse dopo un mese.

Le *recidive* sono rare. Esse sono più frequenti dopo un attacco leggero che non dopo un attacco grave, per cui può accettarsi come massima che, avvenuta la guarigione, l'uomo acquista lentamente la sua immunità e rimane, almeno per un certo tempo, ben vaccinato.

Per ciò che riguarda le *lesioni anatomiche*, la febbre gialla può considerarsi come il tipo delle malattie steatogene, poichè se dal lato sintomatologico dominano i fenomeni congestivi ed emorragici, dal lato anatomico si presentano in prima linea le lesioni degenerative.

Infatti all'autopsia troviamo:

1° nei *centri nervosi*: iperemie, infiltrazioni sierose, forte stato congestivo ed emorragia delle meningi e dello strato superficiale degli organi cerebro-spinali con un *maximum* nella porzione dorso-lombare della midolla spinale, fatto questo che si ritiene universalmente in rapporto con la *rachialgia* che è uno dei sintomi iniziali più caratteristici della febbre gialla;

2° *nell'apparato respiratorio*: ecchimosi nelle pleure e nei polmoni, e talvolta catarro acuto della trachea e dei bronchi;

3° *nell'apparato circolatorio*: degenerazione grassa del miocardio, pericardite sierosa od emorragica;

4° *nell'apparato digestivo*: *stomaco* con i segni di una gastrite acuta più o meno intensa; *intestino* con mucosa talvolta affatto nor-

male, tal'altra iperemica, e nei casi a lungo decorso, anche ulcerata; *fegato* con degenerazione grassa più o meno intensa e generalizzata, comparabile talvolta a quella che si osserva nell'avvelenamento per fosforo o per arsenico e che fa assumere all'organo quell'aspetto così caratteristico, che fu chiamato di « foglia morta », di « cuoio vecchio », di « pelle di camoscio », ecc.;

4° i *gangli mesenterici* sono talora tumefatti, tal'altra di volume, di aspetto e di consistenza normali;

6° *nell'apparato urinario*: *nefrite* acuta più o meno grave con degenerazione grassa degli epiteli renali; *vescica* urinaria quasi sempre contratta, talvolta congesta e contenente scarsa quantità di urina, d'ordinario albuminosa, raramente emorragica;

7° la *milza* partecipa poco alle lesioni della febbre gialla: essa rimane quasi sempre del volume normale e si presenta soltanto un po' ingrossata quando la malattia abbia oltrepassato l'ottavo giorno.

Questo fatto acquista una certa importanza diagnostica inquantochè serve a stabilire una distinzione radicale fra la febbre gialla e tutto il gruppo delle febbri palustri.

8° Riguardo al *sangue*, oltre alla notevole dissoluzione globulare ed al suo contenuto in *urea*, che fu verificato in proporzioni molto variabili (dal 0.05 a 3.87 $^0/_{00}$), richiamano l'attenzione le emorragie che per la loro frequenza, la loro gravità e la moltiplicità delle vie per le quali si producono, costituiscono un fatto caratteristico della febbre gialla. Queste emorragie possono verificarsi:

a) per le soluzioni di continuità o per le superficie della cute semplicemente denudata di epidermide;

b) nello spessore della cute intatta (petecchie, porpora, placche violacee, ecc.);

c) nel tessuto sottocutaneo ed intermuscolare;

d) nello spessore ed alla superficie delle mucose esterne (mucosa oculo-palpebrale, auricolare, faringo-buccale, linguale, gengivale, nasale, ecc.);

e) nello spessore ed alla superficie della mucosa gastro-intestinale (dejezioni e vomiti neri, forma emorragica la più caratteristica della febbre gialla);

f) per le mucose uretrale e vescicale (assai rare);

g) nello spessore ed alla superficie delle sierose, delle meningi cerebro-spinali e dei diversi organi parenchimatosi.

In complesso dunque non esiste alcuna lesione veramente patognomonica della febbre gialla. La stessa tendenza così pronunciata alla degenerazione grassa ed alla ematolisi si osserva pure in molte altre malattie (avvelenamenti per fosforo, arsenico ed alcool, febbre tifoide, tifo ricorrente, scorbuto, ecc.).

Anche le alterazioni catarrali della mucosa gastro-intestinale, le erosioni della mucosa gastrica, l'iperemia delle meningi e di certi parenchimi, quantunque presentino nella febbre gialla una importanza particolare, tuttavia conviene riflettere che non sono affatto speciali a questa malattia, ma che si riscontrano in molti altri stati morbosi, talora come lesioni iniziali, talaltra come lesioni secondarie.

Malgrado ciò, nel loro complesso, le alterazioni della febbre gialla costituiscono bene, come dice Jaccoud: « un criterio anatomico più netto e meglio definito di quello della maggior parte delle malattie infettive ».

Qual' è il processo e l'agente patogenetico di una forma morbosa così grave e complessa?

In un'epoca molto anteriore era assai accreditata fra i medici l'opinione, secondo cui la febbre gialla era dovuta ad influenze malariche.

Successivamente si ammise l' esistenza di qualche microbo specifico, alla cui ricerca si sono affaticati invano molti bacteriologi.

Sui risultati di questi studii, per lo più negativi od erronei, talvolta anche fantastici e paradossali, è affatto superfluo ora discutere.

Il dott. G. Sternberg (1) di Baltimora, autore del contributo etiologico più recente, più abbondante e meglio condotto che si conosca fin oggi, dichiara che il microbio specifico della febbre gialla è ancora da trovarsi ed afferma doversi prendere di nuovo *ab initio* tutta la questione (2).

---

(1) « Report on the Etiology and prevention of Yellow Fever ». Washington, 1890.

(2) Malgrado il riserbo impostomi nella facile e poco interessante critica dei lavori intorno alla etiologia della febbre gialla, non mi è possibile passare sotto silenzio molte pubblicazioni del dott. D. Freire di Rio Janeiro, il quale da molti anni insiste sulla scoperta di un microbio che egli considera come l'agente specifico di questa malattia.

Il microbio del dott. D. Freire sarebbe un « micrococco nero con un punto chiaro centrale » (*micrococcus* o *criptococcus xantogenicus*) fluidificante la

Malgrado ciò d'accordo con la maggior parte degli autori e basandosi non solamente sui frequenti reperti bacteriologici negativi che si ottengono dai visceri e dal sangue del cadavere, ma altresì sulla sede gastrica delle principali manifestazioni morbose, STERNBERG crede che si tratti molto probabilmente di un' infezione locale avente la sua sede principale nello stomaco. Quivi l'agente infettivo, tuttora sconosciuto, elaborerebbe quelle sostanze tossiche il cui assorbimento per parte del sangue, darebbe luogo ai sintomi generali caratteristici della febbre gialla.

Conseguente a questa idea, STERNBERG, con tutti gli altri autori, consiglia infatti nel trattamento della febbre gialla, l'uso degli alcalini e dei disinfettanti gastro-intestinali.

II.

Ricerca ed isolamento del microbio specifico della febbre gialla dall'ammalato e dal cadavere.

Le mie prime ricerche rimontano al febbraio dell'anno 1896.

Chiamato dall'Università della Repubblica dell' Uraguay a fondare e dirigere l' Istituto d' Igiene Sperimentale di Montevideo, fu una delle mie principali cure, installare un piccolo Laboratorio nel Lazzaretto dell' Isola di Flores, situata nel Rio della Plata, a poche leghe da Montevideo.

In questo Lazzaretto, durante la stagione estiva, sogliono occorrere sempre alcuni casi di febbre gialla, in individui procedenti,

---

gelatina, capace di produrre del pigmento giallo e nero (la materia del vomito nero!), delle ptomaine liquide e gassose, suscettibile di moltiplicarsi per sporulazione, di incapsularsi durante l'inverno..... di attenuarsi, di trasformarsi in vaccino, ecc., ecc.

Effettivamente, dopo una curiosa conferenza di propaganda, alla quale potei assistere durante il mio soggiorno in Rio Janeiro, Il dott. D. FREIRE mostrò al microscopio dei cocchi ordinari, che non avevano però alcun rapporto morfologico coi cocchi così fantasticamente segnalati in tutti i suoi innumerevoli scritti.

La constatazione di questo solo fatto, ci risparmia quindi molti inutili ed ingrati giudizi sull'opera strana di questo scienziato, che è rappresentata pur troppo da una lunga e deplorevole serie di pubblicazioni, affatto prive di ogni verosimiglianza, di ogni serietà e di ogni base scientifica.

su vapori mercantili, da Rio de Janeiro o da Santos, ove di solito il tifo icteroide regna, più o meno intensamente, allo stato endemico.

Mia intenzione era infatti quella di cominciare con ricerche di orientamento al Lazzaretto dell'Isola di Flores, avanti di recarmi al Brasile a studiare sopra più abbondante materiale.

All'Isola di Flores, ove fui gentilmente assistito dal medico del Lazzaretto dott. Devincenzi, potei studiare accuratamente i seguenti tre casi, due dei quali seguìti da morte.

Osservazione I.

James Murray di Manchester (Inghilterra), di 17 anni, garzone a bordo del vapore mercantile « Aymestrey ».

Procedente dal Capo di Buona Speranza si trattenne per circa 20 giorni in Rio Janeiro, sbarcando molte volte a terra. Si ammalò durante il viaggio fra Rio Janeiro e Montevideo il 20 febbraio e morì all'Isola di Flores il 26 dello stesso mese a ore 8 pom., cioè dopo 6 giorni di malattia.

Durante la malattia ebbe un solo vomito nero abbondante e tre enterorragie imponenti il giorno stesso della morte.

Autopsia (eseguita 18 ore dopo la morte).

Aspetto esterno: rigidezza cadaverica poco pronunciata, colore della cute giallo-chiaro, macchie ipostatiche delle parti declivi.

Cranio: forti aderenze fra la volta cranica e le meningi che appaiono edematose e congeste: la massa encefalica e la midolla spinale presentano un colorito itterico assai marcato.

Torace: antiche aderenze nella cavità pleurica destra; forte ipostasi polmonare; cuore pallido e flaccido; cavità pericardica contenente seriosità di color giallo.

Addome: lo *stomaco* assai disteso da gas, contiene una discreta quantità di liquido oscuro color rosso-caffè a reazione acida; la mucosa molto congesta presenta vaste ecchimosi ed erosioni epiteliali; gli *intestini* distesi da gas, contengono gran quantità di materia oscura vischiosa; la porzione *tenue* è poco alterata, ma il *colon* ed il *grosso intestino* si presentano congesti e con erosioni che in alcuni punti interessano anche la tunica muscolare. La reazione del liquido contenuto nel duodeno e nel tenue è neutra, quella del colon è acida. Alcuni gangli del mesenterio sono ipertrofici ; il *fegato* sembra alquanto ridotto in volume e presenta un color giallo marcato, dovuto a una evidente degenerazione grassa, il parenchima è assai friabile e quasi esangue; la vescicola biliare, apparentemente sana, contiene circa 30 cmc. di liquido verde, il coledoco è pervio; la *milza* pesa 250 grammi, è flaccida, ma d'aspetto normale; i *reni* sono fortemente congesti; la *vescica urinaria* è contratta e contiene poca quantità di urina limpida, ma albuminosa.

Diagnosi anatomica : febbre gialla.

Ricerche microscopiche.

Trovandomi per la prima volta di fronte ad una malattia le cui lesioni anatomiche avevano sede principale nell'apparato digestivo, rivolsi al contenuto di quest'ultimo le mie prime investigazioni microscopiche.

Eccone il resultato: *stomaco*, il liquido contenutovi è di un color rossiccio, raccolto in un vaso a calice deposita uno strato color feccia di vino, nel quale nuota un liquido rosso-oscuro. L'esame della parte sedimentata dimostra la presenza di una enorme quantità di pigmento sanguigno, di gocce di grasso, di grandi ammassi di cellule epiteliali completamente degenerate in grasso e di microbi. *Intestino tenue:* il liquido contenutovi è di color caffè, senza tracce di sangue rutilante; l'esame microscopico rivela presenza di pigmento amorfo (sangue alterato), di globuli bianchi. cellule epiteliali e microbi. *Grosso intestino:* il contenuto è di reazione alcalina e presenta un color terra di Siena abbruciata. Sembra questa la porzione del tubo intestinale ove le lesioni della mucosa si sono manifestate con maggiore intensità. All'esame microscopico non si rintraccia alcun residuo alimentare e tutta la massa brunastra è costituita da immense zolle di pigmento giallastre, in mezzo a cui si vedono grandi quantità di leucociti, di epiteli del tutto degenerati, riuniti in grandi lembi e colorati in giallo, di globuli rossi più o meno alterati e microbi.

L'esame del *sangue* non rivela nulla di interessante all'infuori di una profonda alterazione di tutte le emazie.

Ricerche bacteriologiche.

Dal sangue, dagli umori e da tutti i visceri pratico una grande quantità di culture su svariati mezzi nutritivi, dai quali, mercè un lungo e paziente lavoro di selezione, riesco ad isolare in culture pure sette varietà microbiche, il cui studio ulteriore mi permise identificarle nelle seguenti specie, collocate per ordine di frequenza:

1ª *Proteus vulgaris*: specie predominante in ogni parte del cadavere sopra tutte le altre e presente da sola in cultura pura nella milza e vescicola biliare. Le colonie in gelatina delle prime culture del cadavere erano perfettamente rotonde, regolari, fluidificanti, iridescenti e con nucleo centrale a forma raggiata; solamente nelle colture successive potei verificare nella gelatina la comparsa delle caratteristiche colonie globose, gomitolari con ciuffi.

Le culture in brodo di questo *proteus*, inoffensive per le cavie, uccidevano i conigli in 12 ore, alla dose di 0.2 cmc.

2ª *Colibacillo*: predominante nello stomaco e nel fegato, abbondante nel sangue e in tutti i visceri del cadavere.

3ª *Bacillo fluidificante x*: saprofita volgare, fluidificante rapidamente la gelatina, con reazione indol-nitrosa. Specie non patogena negli animali, abbondante nell'intestino crasso, assente in tutto il resto.

4ª *Diplococco fluidificante x*: predominante nell'intestino grosso e tenue: assente in tutto il resto. Specie non patogena per gli animali.

5ª *Bacillo pseudo-tifico:* microbio che presenta tutti i principali caratteri morfologici e biologici dal vero bacillo di Eberth (reazione negativa dell'indolo,

non fermenta nè il lattosio, nè il saccarosio, fermenta il glucosio, si sviluppa su gelatina di Holz, non coagula il latte, non arrossa l'agar al tornasole di Wurtz etc). È patogeno per le cavie e per i conigli e si distingue da 4 varietà di bacillo tifico autentico, studiate contemporaneamente come controllo, perchè queste ultime tollerano in 10 cmc. di brodo solamente 9 gocce della miscela cloro-fenica Parietti, mentre il primo può svilupparsi, quantunque lentamente, anche in presenza di 15 gocce e si sviluppa inoltre abbondante sulle patate.

Questo microbio pseudo-tifico fu isolato in scarso numero solamente dal sangue del cuore.

6ª *Bacillus pyocyaneus*: ritrovato in scarsa quantità nel contenuto dell'intestino crasso.

7ª *Bacillo cromogeno x*: saprofita volgare di color giallognolo, fluidificante la gelatina, affatto privo di qualsiasi azione patogena, ritrovato in una sola colonia nel contenuto gastrico.

Dopo uno studio dettagliato di queste sette specie microbiche e dopo svariate e molteplici esperienze di patologia comparata, instituite sopratutto con la specie n° 5, mi convinsi che a nessuna di esse poteva venire attribuita qualche significazione etiologica nella febbre gialla e considerai perciò, sopratutto il *proteus* ed il *colibacillo*, come gli agenti di una infezione mista secondaria, capaci tutto al più, di aver precipitata la morte del paziente, a cagione della loro rapida ed abbondante diffusione nell'organismo.

Osservazione II.

Carl Jensen di Bergen (Norvegia) di 23 anni, macchinista a bordo del vapore mercantile « Munin ».

Cadde ammalato il 20 marzo, due giorni dopo aver lasciato il porto di Rio Janeiro, ove era rimasto per sette giorni, ma senza scendere a terra. Il vapore « Munin » si era tuttavia provveduto in Rio di acqua, verdure, carne e zavorra.

La malattia cominciò con un intenso brivido di freddo della durata di due ore.

Il giorno seguente si manifestarono la cefalea, la rachialgia ed il vomito bilioso, che durarono per tutto il terzo giorno. Al quarto giorno si verificò una remissione di tutti i sintomi morbosi, così che l'ammalato, del tutto padrone della propria intelligenza, si considerò come guarito. Ma il quinto giorno fu sorpreso da abbondanti e ripetuti vomiti di sangue, cominciò l'anuria e nella notte cadde in delirio.

Trasportato al 6° giorno all'ospedale del Lazzaretto, presentava già intensa itterizia, alito fetente, lingua saburrale ed ulcerata, polso filiforme e irregolare, temperatura ascellare a 37° 5'.

Pratico una incisione asettica in un polpastrello della mano e raccolgo varie gocce di sangue che semino in brodo ed alle superficie di vari mezzi nutritivi.

A ore 4 della mattina del 7° giorno (26 marzo) il paziente muore in coma.

AUTOPSIA (eseguita 2 ore dopo la morte):

Aspetto esterno: cadavere ancor caldo, con tegumenti cutanei macchiati di color giallo canario: estese zone ipostatiche in tutte le parti declivi.

Cranio: massa cefalica di aspetto normale, edema meningeo di colore itterico.

Torace: *polmoni* normali con iperemia e leggero catarro della trachea e dei grossi bronchi; *cuore* normale contenente sangue in gran parte ancor liquido; *pericardio* con piccola quantità di trasudato sieroso, giallognolo.

Addome: *stomaco* disteso da gas, fortemente congesto e contenente piccola quantità di liquido rossastro; *intestino tenue* quasi vuoto, alquanto congesto ed in vari punti con abrasioni epitelliali.

Ghiandole del mesenterio: normali.

Fegato di volume e consistenza normali, di color giallo diffuso e ricco di sangue. La vescicola biliare contiene circa 30 cmc. di liquido verdastro, assai vischioso, però il condotto coledoco è completamente pervio.

Milza alquanto ingrossata, di colore oscuro, dura e resistente al taglio.

Reni con le note anatomiche della nefrite acuta assai intensa.

Vescica urinaria molto contratta e quasi nascosta dietro al pube, contiene circa 100 cmc. di urina torbida, albuminosa ed ematurica.

DIAGNOSI ANATOMICA: febbre gialla.

ANALISI CHIMICA DEL SANGUE: (1) contenuto in urea = al 3.35 ‰.

RICERCHE BACTERIOLOGICHE. Preparo grandi quantità di culture nei più svariati mezzi nutritivi, da tutti i tessuti, da tutti gli umori e da tutte le cavità del cadavere.

Il risultato dello studio delle colonie e del loro isolamento, effettuato nello stesso laboratorio della Isola di Flores, durante 18 giorni consecutivi, fu il seguente: Dal sangue estratto dal dito dell'ammalato il giorno precedente la morte, come pure dal sangue del cadavere dalla milza, dal fegato, dai polmoni, dalla urina e dalla bile, isolo in cultura pura e in discreta quantità un bacillo, che a tutta prima mi parve presentare qualche carattere interessante e meritevole d'attenzione e che gli studii successivi mi fecero, infatti, dapprima sospettare e più tardi considerare come l'agente specifico della febbre gialla.

Questo microbio trovavasi soltanto nei reni e nel catarro bronco-tracheale, associato al *colibacillo*.

---

(1) Il processo analitico impiegato correntemente in tutte le mie ricerche per la determinazione dell'urea nel sangue è stato il seguente: ottenuto l'estratto alcoolico del sangue, evaporo a siccità e riprendo con alcool assoluto a freddo. Evaporato l'estratto alcoolico, ridisciolgo nell'acqua e precipito con sotto-acetato di piombo; filtro ed elimino l'eccesso di Pb, con una corrente di H_2S; filtro di nuovo per separare il Pb S e concentro il liquido a bagno-maria sino a pochi centimetri cubici. In seguito doso l'urea con l'ipobromito (vedi: *Encyclop. Chim. de* FREMY. T. IX. II sec. II f.) p. 175.

Non potei riuscire ad isolarlo da nessuna fra le numerose culture piatte eseguite dal contenuto gastro-intestinale, in cui molte varietà di *colibacilli* dominavano da sole allo stato di assoluta purezza.

Siccome una rapida ed attenta rassegna delle principali proprietà biologiche e morfologiche di questo microbio, me lo aveva segnalato tosto come una specie affatto nuova, caratteristica ed interessante, così io volli approfittare delle condizioni eccezionalmente facili di diagnosi morfologica differenziale nelle quali mi trovavo, sopratutto rispetto al *colibacillo*, esistente in cultura pura nel canale digestivo, per segnalare in questo ultimo la presenza del nuovo microbio, isolato dal cadavere.

Ma tutte le mie pazienti ricerche riuscirono infruttuose, quantunque fosse supponibile che per effetto delle frequenti emorragie della mucosa digestiva, il suddetto microbio, presente nel sangue circolante, avrebbe dovuto passare, almeno in piccolo numero, anche nella cavità gastro-intestinale.

Questi miei risultati negativi non possono escludere infatti tale evantualità, ma frattanto depongono nel senso che il microbio della febbre gialla, come quello della febbre tifoidea, non ha certo il suo *habitat* favorito nel tubo digestivo.

Vedremo più tardi, come questo primo reperto vada completamente d'accordo con la teoria patogenetica della febbre gialla, che si è andata a poco a poco sviluppando coi risultati delle mie ricerche.

Osservazione III.

Rasmus Hille di Bergen (Norvegia), di 32 anni, marinaio a bordo dello stesso vapore mercantile « Munin ».

Si ammalò nello stesso giorno che il suo compagno di bordo, presentando presso a poco i medesimi fenomeni morbosi, con la sola differenza che il vomito rimase bilioso e non si verificarono quindi gastrorragie.

Sbarcò all'Isola di Flores al 6° giorno di malattia, con sintomi generali molto attenuati e una temperatura ascellare di 38° o.

Il giorno dopo (26 marzo), a ore 8 del mattino, la temperatura era 37° 8'; il paziente avvertiva nonostante cefalagia, rachialgia e dolore epigastrico.

Pratico un piccolo salasso asettico del polpastrello di un dito, raccolgo asetticamente dell'urina ed eseguisco numerosissime culture dalle feci.

Le culture praticate dal sangue rimasero affatto sterili, quelle praticate dall'urina, che era assai albuminosa, dettero due varietà di *colibacillo* ed un grosso cocco, le culture dalle dejezioni dettero il *colibacillo* ed un grosso bacterio fluidificante.

Al giorno seguente l'infermo era affatto apiretico ed entrò in franca convalescenza.

***

Dopo avere studiato e raccolto rapidamente nello stesso laboratorio della Isola di Flores, i dati più interessanti circa la morfologia e la patogenia del

microbio che aveva richiamato in maniera particolare la mia attenzione, feci ritorno in Montevideo, ove sino al successivo giugno, mi dedicai attivamente a sviluppare intorno ad esso una lunga serie di ricerche e di esperienze.

I risultati di tali esperienze formano infatti una parte principale di questa stessa memoria ed il loro significato mi apparve infine di tale importanza, da spingermi a proseguire con maggior impegno sulla medesima via.

Decisi quindi di recarmi nella stessa Rio Janeiro allo scopo di avere a mia disposizione un materiale di studio più abbondante.

Fra questo materiale di studio, senza perdere naturalmente di vista tutt gli altri microbi al cui isolamento completo e sistematico io credei sempre utile di procedere durante tutte le mie investigazioni, rivolsi soprattutto l'attenzione alla ricerca del microbio suddetto, che per intenderci meglio chiameremo per ora col nome improprio di *bacillo icteroide*.

Già edotto dei risultati della Oss. I e sopratutto dalla relazione delle numerose ed infruttuose ricerche di STERNBERG, compresi tosto che nella febbre gialla le infezioni miste secondarie dovevano essere straordinariamente frequenti.

Avanti di partire per Rio Janeiro volli quindi famigliarizzarmi con la diagnosi bacteriologica rapida del *bacillo icteroide*.

Ciò mi riuscì facile grazie ad un artifizio di cultura, oltremodo semplice ed originale, il quale permette di distinguere a colpo d'occhio sul gelosio, anche dopo sole 24 ore, la cultura del bacillo icteroide, da quelle di tutti gli altri microbi sin' ora conosciuti da noi.

Senza questo artificio, la cui tecnica verrà più esattamente descritta più innanzi, io credo che sarebbe stato quasi impossibile, per chiunque, avventurarsi con esito nella ricerca del *bacillo icteroide* che, come vedremo, trovasi di solito nei cadaveri in numero scarso e mescolato a molte altre specie microbiche, fra cui domina fatalmente il *colibacillo*, col quale è oltremodo facile una confusione.

Oltre alla rapida diagnosi differenziale suddetta per mezzo delle culture su gelosio, io impiegai sempre in tutte le mie ricerche le culture nel brodo con lattosio al 2 $^0/_0$ addizionate di $Ca\,CO_3$, giacchè il *bacillo icteroide* quantunque come vedremo in seguito, attacchi debolmente il lattosio, tuttavia non produce una evidente fermentazione dei brodi lattosati e ciò costituisce un altro eccellente mezzo diagnostico per distinguerlo immediatamente dal *colibacillo*.

Però intorno a questo secondo artifizio di tecnica devesi tener presente un'avvertenza, senza conoscer la quale il ricercatore si esporrebbe ad un sicuro insuccesso, tutte le volte che si incontrasse nel *bacillo icteroide* mescolato con lo *streptococco* il che avviene con grande frequenza.

Nè il *bacillo icteroide*, nè lo *streptococco*, coltivati separatamente nei brodi Perdrix, producono fermentazione apparente: allorquando invece trovansi uniti, attaccano lo zucchero con produzione di acido lattico e successiva formazione di lattato di Ca, a spese del carbonato che pone in libertà abbondanti bollicine di gas acido carbonico.

La ignoranza di questo fatto esporrebbe quindi il ricercatore a considerare ed a rigettare tosto come *colibacillo* lo stesso *b. icteroide*,

allorquandò questo si trovasse in una cultura in brodo lactosato insieme allo *streptococco*.

Una piccola parte dell'abbondante materiale bacteriologico riunito in Rio Janeiro, potei diagnosticarlo e classificarlo a misura che andava raccogliendolo, ma nella maggior parte dei casi, la estrema frequenza e complessità delle infezioni miste, non mi dava il tempo necessario per la identificazione delle singole colonie, per cui mi limitava volta per volta al loro rapido isolamento, riservando al mio ritorno in Montevideo il successivo lungo e paziente lavoro di classificazione e di diagnosi bacteriologica.

Allorquando giunsi a Rio Janeiro, il 9 giugno dello scorso anno, l'epidemia di febbre gialla trovavasi già al suo periodo di rapida declinazione.

Mercè la indimenticabile cortesia del sig. dott. C. Seidl, direttore dell'Ospitale di S. Sebastiano, potei installare immediatamente il mio laboratorio di viaggio in quello stabilimento riservato agli ammalati di febbre gialla, ove durante il corso delle mie ricerche trovai inoltre la gentile assistenza dei sigg. dottori Fr. Fajardo ed M. Couto. A questi tre distinti colleghi sento il dovere di rivolgere vivi ringraziamenti per la obbligante ed efficace opera loro.

Nell'Ospitale di S. Sebastiano, durante i mesi di giugno e luglio, ebbi agio di potere studiare accuratamente sotto il punto di vista clinico, bacteriologico ed anatomo-patologico 10 ammalati di febbre gialla tipica. Di questi dieci, uno solo guarì dopo essere stato in condizioni gravissime. Esso è oggetto della seguente:

Osservazione IV.

Alexandre Kraczkevitch di 44 anni, carpentiere, di Varsavia (Polonia).

Residente in Rio Janeiro da 5 anni e mezzo.

Entra all'Ospitale S. Sebastiano il 10 giugno, presentando già da quattro giorni i sintomi della febbre gialla.

Al momento del suo ingresso presentava la febbre a 39.° 6′ con albuminuria, gastralgia e rachialgia. Il giorno 11 cominciano a manifestarsi i vomiti mucosi e continue epistassi, mentre il polso si fa sempre più piccolo. Malgrado ciò la temperatura presenta una gran remissione il giorno 12, ed il 13 torna normale. Però nello stesso giorno appare il *vomito nero* abbondante e comincia l'anuria; al 14 la temperatura risale alquanto sino a 37.° 8′, la scarsa quantità di urina è fortemente albuminosa e l'ammalato presenta delirio.

Pratico un piccolo salasso asettico dal polpastrello ed eseguisco varie culture dal sangue; fo pure una puntura esplorativa dal fegato ed estraggo una piccola quantità di succo epatico, col quale faccio varie seminagioni.

Tutte queste culture rimangono sterili.

Al giorno seguente (15) il paziente è affatto anurico, in preda a violento delirio, quantunque la temperatura oscilli fra 37°, 4′ e 37°, 1′.

Pratico nuovamente punture dal polpostrello e dal fegato, ed eseguisco varie culture. Dai tubi di gelosio seminati con succo epatico ottengo alcune colonie appartenenti a due specie di microbi. La prima specie, più numerosa era rappresentato da un grosso bacterio fluidificante, la 2.ª, assai scarsa, dal *b. icteroide.*

Il giorno 16 diminuisce il delirio e riappare l'urina; nei giorni successivi si accentua un miglioramento progressivo, di tutti i sintomi: la temperatura oscilla fra 36°, 8′ e 37°, 2′ il 19 si manifesta l'ittero generale: il 23 disminuisce la quantità di albumina nell'urina, ed il 26 scompare del tutto. Il paziente esce dall'Ospitale, completamente guarito.

Osservazione V.

Silverio J. Lopez, di 22 anni (portoghese) inserviente al cimitero S. Francesco Saverio, residente in Rio Janeiro da 8 mesi.

Il 12 giugno è assalito improvvisamente da brivido, rachialgia e cefalalgia.

Ricovera all'Ospitale il 14 detto con tutti i sintomi della febbre gialla gravissima.

Il giorno 13 cominciano il *vomito nero* e *l'anuria*, il 16 si verifica un lieve miglioramento di tutti i sintomi, ma sul far della sera del 17 le condizioni si aggravano di nuovo ed il paziente muore quasi improvvisamente alle ore 11 di notte, dopo circa 5 giorni di malattia.

TEMPERATURA DELL'INFERMO

Giugno	Mattina	Sera
14	39.8	40.0
15	39.0	39.6
16	38.4	38.6
17	37.0	37.7

Autopsia (Eseguita 8 ore dopo la morte):

Aspetto esteriore: tegumenti cutanei di color giallo diffuso.

Torace: abbondante trasudato, sieroso, giallastro nel pericardio, degenerazione grassa del cuore; polmoni normali.

Addome: stomaco con i segni dalla gastrite acuta e contenente liquido sanguinolento; *intestini* alquanto iperemici; *fegato* color foglia secca, *vescicola biliare* quasi vuota; *milza* un poco tumefatta: *reni* nefritici, *vescica urinaria* contratta e contenente piccolissima quantità di urina albuminosa.

Diagnosi anatomica: febbre gialla.

Ricerche bacteriologiche:

Preparo grande quantità di culture su gelosio, in gelatina e brodo lattosato.

In tutti questi mezzi nutritivi si sviluppano molte specie microbiche che debitamente isolate, vennero in seguito classificate e distribuite a seconda della loro sede rispettiva, nel seguente ordine:

Sangue: presenza di numerosi bacteri *coliformi, streptococchi* ed un bacterio anaerobio gasogeno; *trasudato pericardico:* scarsi microbi *coliformi, fegato:* grandi quantità di *streptococchi* e *colibacilli, bile:* bacterio anaerobio gasogeno, identico a quello riscontrato nel sangue; *milza: streptococchi* in cultura pura; *reni:* molti *streptococchi* e *collibacilli*, varie colonie di un microbio identico a quello isolato nella Oss. II, e che ho già designato col nome di *b. icteroide.*

Analisi chimica del sangue: urea = 1.35 $^0/_{00}$.

Osservazione VI.

Romeu Ferreira di 11 anni, *negro*, di S. Paolo (Brasile).

Residente in Rio da 5 mesi.

Il 14 giugno è assalito dai principali sintomi della febbre gialla, ma si mantengono così miti che il ragazzo non viene ricoverato all'Ospitale se non il giorno 16 a ore 9.30 di sera con una temperatura di 37°.7'. Durante tutto il giorno seguente (17) lo stato del piccolo infermo sembrava migliorare così rapidamente che venne stabilita una prognosi assolutamente favorevole. Le temp. ascellare era di 37°.0. Durante la notte del 17 al 18 dormì tranquillamente, ma sul far del giorno la temp. salì a 39°.1'. A ore 4 del mattino il fanciullo provò stimolo di sete e siccome, malgrado la febbre, lo stato generale era tuttavia soddisfacente, discese dal letto per afferrare un bicchiere d'acqua.

Ma appena toccato il suolo, venne assalito da un abbondante *vomito nero*, si ripiegò su sè stesso e cadde morto al suolo come fulminato, dopo 4 giorni di malattia.

Autopsia (eseguita 3 ore dopo la morte):

Aspetto esteriore: marcato colore itterico alle sclerotiche.

Torace: degenerazione grassa del *miocardio; polmoni* normali.

Addome: stomaco congesto e ripieno di sangue: *intestini* normali; *fegato* ipertrofico e color giallo caratteristico; *milza* alquanto ingrossata; *reni* congesti; *vescica urinaria* completamente retratta e vuota; *gangli linfatici* del mesenterio enormemente ipertrofici.

Diagnosi anatomica: febbre gialla.

Analisi chimica del sangue: urea = 1,16 $^0/_{00}$.

Ricerche bacteriologiche: Le numerose culture praticate dal sangue, da tutti

gli organi e dal contenuto gastrico e intestinale, dettero come risultato la presenza del solo *colibacillo*, in quantità così straordinaria che il piccolo negro poteva considerarsi come una vera *purée* di *colibacilli.*

Fu quindi assolutamente impossibile rilevare la presenza e procedere all'ulteriore isolamento di altre specie microbiche.

Osservazione VII.

Emanuele Dominici, di 8 anni (italiano).

Residente in Rio Janeiro da 4 anni.

È accolto nell'Ospitale in condizioni gravissime, il 17 giugno a ore 4 di sera, con una temperatura di 39°.5′ e con *vomito nero.*

Durante la notte entra in coma e muore alle ore 8 del mattino, con una temperatura di 36°.2′.

Autopsia (eseguita immediatamente dopo la morte).

Aspetto esteriore del cadavere con tutti i segni propri della febbre gialla.

Torace: cuore grasso; abbondante liquido pericardico di color giallo; catarro bronco-tracheale, polmoni normali.

Addome: stomaco congesto, con varie macchie ecchimotiche e contenente scarse quantità di liquido brunastro; *intestini* diarroici; *fegato* aumentato di volume con colore di foglia morta; *milza* di aspetto normale; *reni* congesti; *vescica urinaria* ripiena di urina albuminosa.

Diagnosi anatomica: febbre gialla.

Ricerche bacteriologiche: Tutti i mezzi nutritivi sui quali avevo seminato ogni sorta di materiale ricavato dal cadavere, dettero come risultato culture purissime e straordinariamente abbondanti di *streptococco.* Solamente le culture dall'urina e dalla bile rimasero sterili.

Il contenuto dello stomaco e dell'intestino dette, come sempre, delle culture quasi pure di *colibacilli*, con vari *streptococchi* e qualche grosso *diplococco* fluidificante.

Analisi chimica del sangue: urea = 3.50 $^0/_{00}$.

Per chiunque non fosse stato preparato a simili sorprese, il reperto bacteriologico di questo caso avrebbe disorientato completamente.

Infatti senza la diagnosi clinica ed anatomica di febbre gialla, questo fanciullo avrebbe potuto considerarsi logicamente come morto per una vera e propria *setticemia a streptococchi*, nella stessa maniera che il piccolo negro della osservazione precedente poteva diagnosticarsi, per il reperto bacteriologico, come morto di *setticemia a colibacillo.*

In entrambi questi casi non fu quindi possibile rintracciare il *b. icteroide.*

Osservazione VIII.

Sadi Jarbar, di 28 anni, lavoratore (arabo).

Residente in Rio Janeiro da tempo indeterminato.

È accolto all'Ospitale San Sebastiano il 17 giugno, in gravi condizioni generali.

Non fu possibile raccogliere alcuna storia anamnestica perchè il paziente non conosce che l'idioma arabo, ciò che fa supporre essere di recente data il suo arrivo al Brasile. Presenta enterorragie abbondanti, faccia congesta e lingua saburrale. Al 18 l'analisi dell'urina rivela molta quantità di albumina. Il 19 trovasi in delirio con temperatura ascellare di 36°.7' : l'urina è scarsa, il polso è debole.

Pratico un piccolo salasso asettico dal polpastrello del dito e ricavo varie goccie di sangue che semino in altrettanti tubi di gelosio e di brodo.

A ore 4 pom. dello stesso giorno faccio due punture esplorative con grosso ago-cannula asettico in corrispondenza della regione epatica. Con la prima estraggo una piccola quantità di succo epatico che semino su vari tubi di gelosio, con la seconda cado nella vescicola biliare e ne estraggo 10 cmc. di bile fluidissima, color verde oscuro, che semino ugualmente in vari mezzi nutritivi.

Al mattino seguente, dopo essere rimasti per circa 18 ore nella stufa a 37° tutti i brodi erano intorbidati e le culture su gelosio inclinato davano il seguente risultato: le seminagioni dal sangue presentavano scarse colonie isolate, quelle eseguite con succo epatico presentavano circa 50 colonie per ogni goccia di succo epatico seminato, le culture della bile presentavano una quantità innumerevole di colonie.

Tutte queste colonie si trovavano allo stato di assoluta purezza ed alla sera del medesimo giorno io le aveva già diagnosticate come appartenenti al *b. icteroide.*

Frattanto l'ammalato aveva cominciato a presentare un lieve miglioramento di tutti i sintomi, ed il giorno 20 il delirio si era così calmato, da lasciar supporre il principio di un miglioramento definitivo.

Ma il 21 si manifestarono abbondanti scariche diarroiche, accompagnate da uno stato adinamico generale e da anuria che aggravarono di nuovo lo stato del paziente; il 22 la diarrea assunse un andamento dissenterico e l'infermo morì a ore 9.30 del mattino seguente (23).

Ad eccezione del 1° giorno del suo ingresso all'Ospitale, in cui oscillò fra 37°.7' e 37°.2', la temperatura del paziente fu sempre subnormale, come rilevasi dal seguente prospetto.

17 VI		18 »		19 »		20 »		21 »		22 »		23 »	
M.	S.	M.	S.	M.	S.	M.	S.	M.	S.	M.	S.	M.	S.
37.7	37.2	36.8	36.4	36.2	36.3	37.8	36.0	35.4	35.8	35.0	35.5	34.9	—

Autopsia (eseguita 2 ore dopo la morte).

Aspetto esteriore: colorito itterico generale.

Torace: assenza di trasudato pericardico, *cuore* flaccido e degenerato; il *sangue* ancor liquido e caldo si coagula nelle pipette, lasciando separare un siero liquido, color giallo intenso; scarsa mucosità bronco-tracheale; *polmoni* sani.

Addome: *stomaco* congesto e quasi vuoto; *intestini* con i segni di una enterite desquamativa acuta, contenenti liquido mucoso, giallastro; *fegato* di dimensioni normali, poco giallo, color foglia morta oscura e assai congesto; *vescicola biliare* ripiena di bile fluida; *milza* flaccida, ma d'aspetto normale; *reni* nefritici; *vescica urinaria* contratta completamente e contenente poche goccie di urina torbida, fioccosa e albuminosa.

Diagnosi anatomica: febbre gialla.

Analisi chimica del sangue; urea $= 3{,}65\ ^0/_{00}$.

Ricerche bacteriologiche. Malgrado che in questo caso la diagnosi bacteriologica fosse stata già stabilita durante la vita, praticai dal cadavere come al solito, una grande quantità di culture.

I risultati furono i seguenti: dal muco tracheale, dal sangue, fegato, bile, milza, reni e urina, ottenni in cultura assai abbondante il *bacillo icteroide*, associato ad uguale quantità di *stafilococco aureo*.

Dal muco tracheale isolai inoltre il *colibacillo* ed una *torula*.

Le culture del contenuto gastrico e intestinale, come sempre, non dettero altro che il *colibacillo* allo stato di purezza.

È rimarchevole il reperto bacteriologico dell'infezione mista ottenuto all'autopsia, in confronto al risultato dell'esame bacteriologico praticato durante la vita in cui si ebbe l'isolamento del *bacillo icteroide* allo stato di cultura pura.

Osservazione IX.

Antonio Ferreira, di 21 anni, operaio (portoghese).

Residente in Rio Janeiro da 15 giorni.

Il giorno 15 giugno entra all'Ospitale già in gravi condizioni, presenta vomito bilioso, forti dolori in varie parti del corpo, sopratutto all'epigastrio, molta albumina nelle urine e lingua arrossata. La temperatura è a $39^0.10'$. Il giorno successivo (18) la temperatura oscilla fra $38^0.4'$ o $37^0.3'$, ma il vomito bilioso si fa sempre più ostinato; il 19 si presentano forti gastrorragie ed emottisi e la temperatura oscilla fra $37^0.0'$ e $37^0.5'$.

Il giorno 20 si manifesta il delirio ed il primo *vomito nero*: la temperatura segna $37^0.5'$; anuria assoluta da 24 ore.

Pratico un piccolo salasso asettico dal polpastrello del dito e una puntura esplorativa del fegato, ma tutte le culture eseguite col materiale raccolto rimangono sterili.

Il paziente muore a mezzanotte del 21, dopo vari accessi di uremia, con temp. ascellare di $36.^05'$.

Autopsia (eseguita 8 ore dopo la morte).

Aspetto esteriore: presenta tutti i caratteri propri della febbre gialla.

Torace: cuore flaccido con poco liquido pericardico, lieve catarro-tracheale; *polmoni* normali.

Addome: stomaco ripieno di sangue nerastro, con mucosa oltremodo congesta e tumefatta, *intestini* congesti; *fegato* esangue e color foglia morta; *milza* flaccida e alquanto tumefatta; *reni* nefritici; *vescica urinaria* contenente abbondante quantità di urina albuminosa; *gangli linfatici* del mesenterio normali.

Diagnosi anatomica: febbre gialla.

Analisi chimica del sangue: urea = 2,63 $^0/_{00}$.

Ricerche bacteriologiche. La maggior parte delle culture eseguite su mezzi solidi da tutti i visceri e dal sangue, rimangono sterili. Solamente dalle colture in brodo lattosio seminate con molto materiale ricavato dal sangue, dal fegato, dalla milza e dai reni, ottengo lo sviluppo di un medesimo bacillo, assai piccolo, mal colorabile e che non riesco a coltivare su mezzi solidi nè a trasportare in altri mezzi nutritivi liquidi. Da un solo tubo di gelosio fra sei seminati con materiale ricavato del rene, riesco ad ottenere in cultura pura il *b. icteroide:* gli altri rimangono affatto sterili. Dal muco tracheale isolo moltissime colonie di *stafilococco aureo,* di *colibacilli* ed una specie *tifosimile* patogena per le cavie.

Osservazione X.

Carolina Pires, di 39 anni (portoghese).

Residente in Rio Janeiro da 5 mesi.

Si ammala il 15 giugno con tutti i sintomi della febbre gialla e viene ricoverata all'Ospitale in gravissimo stato il giorno 19, presentando già itterizia, *vomito nero*, febbre (38°.0) e dolori generali.

Il giorno 20 si manifesta adimania e delirio; segue il *vomito nero* e la temperatura ascellare è a 39°.0. A ore 4 pom. dello stesso giorno estraggo asetticamente sangue da un polpastrello e lo semino in vari mezzi nutritivi; la stessa cosa eseguisco con un pò di succo epatico ottenuto mercè una puntura esplorativa del fegato.

Tutte queste culture rimangono sterili.

L'inferma muore in coma, il 21 a ore 3 del mattino, dopo 6 giorni di malattia, completamente anurica e con una temperatura di 37°.0.

Autopsia, (eseguita 6 ore dopo la morte).

Aspetto esteriore: con tutti i caratteri proprii della febbre gialla.

Torace: lieve catarro bronchiale, con congestione polmonare, discreta quantità di liquido color giallo nel pericardio.

Addome: stomaco congesto, contenente poco liquido brunastro; *intestini* normali; *fegato* foglia morta; *milza* piccola, normale; *reni* congesti; *vescica urinaria* contratta e quasi vuota.

Diagnosi anatomica: febbre gialla.

Analisi chimica del sangue: urea = 1.75 $^0/_{00}$.

Ricerche bacteriologiche. Sono state le più complesse e difficili di tutte le altre e resultarono infruttuose.

Il *sangue* conteneva tanti microbi e di specie così numerose, che le culture a piatto e per strisciamento, davano l'idea come se si fosse coltivato del materiale in putrefazione.

Dopo un lungo lavoro di selezione, riuscii penosamente ad isolare le seguenti sette specie: 1ª *proteus vulgaris*, 2ª *colibacillo*, 3ª *diplococco fluidificante* non patogeno, 4ª *grosso bacillo* saprofita dell'intestino, 5ª *bacterio ovale* settico per le cavie, 6ª *micrococco bianco*, 7ª *bacillo anaerobio* gasogeno, non patogeno.

Il liquido pericardico era sterile.

Dal *fegato* isolai il grosso bacillo n. 4, ritrovato anche nel sangue; dalla *milza* isolai lo *stafilococco aureo* e il *diplococco* n. 3 ritrovato nel sangue; i *reni* contenevano una coltura pura di *stafilococco aureo;* le poche gocce di urina dettero sulle piastre di gelatina una cultura pura di *stafilococco aureo*, ma nelle culture dirette in brodo apparvero dei bacteri di varia forma che non mi fu possibile di isolare nè classificare.

Le numerose culture eseguite col muco tracheale erano invece costituite per la maggior parte dal *proteus vulgaris*, per cui non fu possibile isolare se non altre 3 specie microbiche, cioe: 1ª *il colibacillo*, 2ª uno *pseudo-tifo* patogeno per le cavie, 3ª un *cocco* non patogeno.

In questo caso adunque, a causa delle molteplici infezioni miste, non fu possibile isolare dal cadavere il *bacillo icteroide.*

Questo fatto appare tanto più rimarchevole, inquantochè 12 ore appena innanzi la morte, le culture praticate col sangue e col succo epatico, erano rimaste sterili.

Ciò significa che le infezioni miste secondarie fecero irruzione nell'organismo e vi si svilupparono con eccezionale rapidità, poche ore innanzi la morte. È anche probabile che esse ne sieno state la causa immediata.

Osservazione XI.

Augusta Lehmann, di 25 anni, domestica (Polonia Russa).

Residente in Rio Janeiro da 11 giorni.

Il 19 giugno è attaccata da tutti i sintomi gravi della febbre gialla ed il 21 successivo, cioè dopo 3 giorni di malattia, è trasportata all'Ospitale in grave stato.

Presenta *vomito nero*, lingua emorragica, delirio, scarsa urinazione con molta albumina e 40° di temperatura.

Dopo il suo ingresso all'Ospitale la temp. comincia ad abbassarsi senza interruzione; il 22 si manifesta il singhiozzo continuo ed una intollerabile cefalalgia; fra il 23 ed il 24 compaiono l'anuria, polso irregolare, delirio e la temperatura discende sino a 35°. Si manifesta una tumefazione in corrispondenza della regione parotidea sinistra (parotite acuta). Il 25 la temperatura risale un istante a 37°.7′ ma lo stato generale rimane invariato; al 26 la temperatura

ridiscende a 35° ed alle 4 di sera la paziente muore in stato comatoso, dopo 7 giorni di malattia.

AUTOPSIA (eseguita subito dopo la morte).

Aspetto esteriore: colorito giallo-limone intenso di tutta la cute.

Torace: lieve catarro bronchiale diffuso, con *polmoni* alquanto edematosi; *cuore* flaccido con scarso liquido nel pericardio.

Addome: *stomaco* congesto contenente sangue nerastro; *intestini* quasi normali; *fegato* color giallo cereo, compatto, esangue; *vescicola biliare* ripiena di bile densa, filante, color verde bottiglia; *milza* piccola e normale; *reni* con tutto l'aspetto della nefrite acuta; *vescica urinaria* contratta e contenente poche gocce di urina torbida e albuminosa.

DIAGNOSI ANATOMICA: febbre gialla.

ANALISI CHIMICA DEL SANGUE: urea 4.58 ‰.

RICERCHE BACTERIOLOGICHE. Tutte le culture eseguite dal sangue rimangono sterili; solamente in un tubo di brodo-lattosio, ove aveva introdotti circa 10 cmc. sangue ancor liquido, si sviluppa in mezzo al coagulo di fibrina una colonia di biancastra che successivamente studiata, si identificò con lo *stafilococco aureo.*

Dal succo della *milza* e dei *reni* si riesce ad isolare solamente qualche colonia di *stafilococco aureo.* La *bile* ed il *liquido pericardico* rimangono sterili. Dall'*urina* si isola lo *stafilococco aureo* ed il *colibacillo.* In quanto alle ricerche batteriologiche, quelle eseguite sul *fegato*, presentarono un eccezionale interesse. Infatti le numerose seminagioni rimasero tutte sterili ad eccezione di una ottenuta in brodo-lattosio mercè la seminagione di circa 3 cmc. di succo epatico. In queste culture l'esame microscopico dimostrò l'esistenza di un bacillo, la cui frequente tendenza a presentarsi in forma di *clava*, mi fece pensare al *b. icteroide.* Vedremo infatti più tardi che il microbio della febbre gialla presenta spesso, sovratutto nei primi passaggi in brodo e dopo pochi giorni di cultura nel medesimo, una marcata tendenza ad assumere forme degenerative.

Ma i miei primi tentativi per ottenere il trasporto del microbio dalla miscela di brodo e succo epatico, sopra i comuni mezzi nutritivi, riuscirono vani.

Solamente al mio ritorno in Montevideo, dopo avere esauriti, senza risultato alcuno, infiniti artifizi d'ogni maniera, inoculai tutta la cultura originale, in parte sotto la cute e in parte nella vena auricolare di un piccolo coniglio, al quale praticai inoltre la inoculazione sottocutanea di 1 cmc. di una forte toxina di *colibacillo,* che ripetei per due giorni consecutivi. Al 6° giornò il coniglio morì per infezione mista da *bacillo icteroide,* che potei isolare in cultura pura, e da *stafilococco aureo.*

Le culture praticate dal succo della parotide nel cadavere, dettero allo stato di purezza lo stesso *stafilococco aureo.* Il muco tracheale conteneva pure lo *stafilococco aureo* ed il *colibacillo.*

In questo caso quindi si trattò di una intossicazione generale determinata da un numero relativamente assai scarso di microbi specifici. È chiaro che tale intossicazione favorì una invasione secondaria per parte dello *stafilococco aureo*, ma siccome tutti i sin-

tomi clinici presentati dall'inferma sino alla sua morte erano stati quelli della intossicazione amarilla, così sulla causa immediata del decesso e sul consecutivo reperto bacteriologico deve accettarsi una delle seguenti interpretazioni: o il microbio della febbre gialla, anche in piccole quantità, segrega un veleno straordinariamente attivo, o la successiva invasione dello *stafilococco aureo*, fece sparire ovverossia attenuò le facoltà vegetative del *b. icteroide*.

È anche possibile ritenere che la morte siasi verificata semplicemente per intossicazione uremica.

Queste ipotesi non presentano però una soluzione definitiva possibile, inquantochè, come vedremo più innanzi, esse sono ugualmente ammissibili.

Osservazione XII.

Paolo Barreiro, di 27 anni, operaio (spagnuolo).

Residente in Rio Janeiro da 14 mesi.

Viene ricoverato all'Ospitale il 1° luglio, avendo già 10 giorni di malattia e presentando i seguenti sintomi principali: cefalalgia, fotofobia, gastralgia ed epatalgia, albumina nelle urine, lingua saburrale, polso irregolare, vomito mucoso verdastro e temperatura ascellare di 38°.5'.

Durante la sua permanenza all'Ospitale l'infermo si conservò costantemente in condizioni presso a poco identiche, finchè morì a ore 3.15 ant. del 3 di luglio, con una temperatura di 39°.3' e dopo circa 12 giorni di malattia.

Autopsia (eseguita dopo 6 ore).

Aspetto esteriore: superficie cutanea con vaste suffusioni sanguigne e larghe zone color giallo intenso, specialmente alla faccia, al collo ed al petto.

Torace: poco liquido nel pericardio; *cuore* flaccido contenente sangue molto oscuro, ancor fluido; *trachea* straordinariamente congesta; la mucosa presenta un colore rosso-vinoso in tutto il suo spessore ed è ricoperta da una lieve essudazione muco-catarrale.

Addome: lo *stomaco* è congesto e contiene scarsa quantità di materia biliosa; gl'*intestini* sono quasi normali, il *fegato* è molto resistente, compatto, esangue, quasi duro, di color giallo vivo; la *vescicola biliare* contiene una bile talmente spessa che a gran pena può aspirarsi con le ordinarie pipette Pasteur; la *milza* è assai ingrossata, congesta e friabile; i *reni* sono nefritici; la *vescica urinaria* è in parte riempita di urina un pò torbida e albuminosa.

Diagnosi anatomica.: febbre gialla.

Analisi chimica del sangue: urea = 4.19 %.

Ricerche bacteriologiche. — Tutte le numerose culture eseguite con abbondante materiale dal sangue, dal fegato, dalla bile, dalla milza e dall'urina, ri-

masero affatto sterili; dai reni isolai varie colonie di un bacillo simile a quello del colera dei polli e molto patogeno per i conigli.

Due soli tubi di gelosio, seminati con sangue del cuore, manifestarono, presso al liquido di condensazione, lo sviluppo di una cultura diffusa, poco abbondante, costituita di bacilli identici a quelli della febbre gialla, ma il cui accrescimento si arrestò ben presto.

Non mi fu possibile ottenere a Rio Janeiro, trasporti successivi di queste ultime culture, e solamente dopo il mio ritorno in Montevideo, mercè un artifizio analogo a quello impiegato nel caso precedente, potei identificare il microbo così penosamente isolato per quello della febbre gialla.

Da 22 culture praticate dal muco tracheale, isolai le seguenti 5 specie microbiche: 1° *streptococco;* 2° *stafilococco albo;* 3° *b. mesentericus vulgatus;* 4° *colibacillo;* 5° *pseudo-tifo.*

Osservazione XIII.

Manuel Rodriguez da Carvalho, di 17 anni, operaio (portoghese).

Residente in Rio Janeiro da 20 giorni.

Viene ricoverato all'Ospedale a ore 9 ant. del 1° luglio con temperatura di 37°. 7′ avendo già quattro giorni di una malattia che presenta tutti i sintomi della febbre gialla e cioè: cefalalgia, lingua saburrale, rachialgia, vomito bilioso, dolore epigastrico e albumina nelle urine.

Alla sera la temperatura sale a 38°. 6′; al giorno seguente comparisce il *vomito nero*, ma il paziente urina assai bene (950 gr. di urina in 12 ore) e presenta durante tutto il giorno una temperatura oscillante fra 37°. 3′ e 37°. 4′. Il 3 luglio si aggravano maggiormente tutti i sintomi, comincia l'anuria (100 gr. di urina in 17 ore) e si manifesta un sub-delirio accompagnato dal quadro completo dei fenomeni uremici, mentre il *vomito nero* si arresta.

Si pratica il cateterismo vescicale, ma non si riscontra urina in vescica; la temperatura si mantiene sempre fra 37° 3′ e 37°. 2′.

Al mattino del giorno 4 l'ammalato entra in delirio e presenta una ipotermia di 36°: mercè un nuovo cateterismo si estrae una certa quantità di urina contenente molta albumina, ma ben tosto la respirazione si fa dispnoica, la temperatura discende rapidamente e il paziente muore a ore 5 pom. dopo 8 giorni di malattia.

Autopsia. (Eseguita immediatamente dopo la morte).

Aspetto esteriore: colorito generale giallo pagiia, con numerose macchie rossastre distribuite in varie parti del corpo.

Torace: cuore flaccido, contenente sangue ancor fluido; abbondante essudato mucoso-emorragico lungo l'albero respiratorio; tessuto polmonare sano

Addome: stomaco congesto ed ecchimotico, quasi vuoto; *intestini* di aspetto normale; *fegato* esangue, eompatto, duro, di color giallo vivo; *vescicola biliare* contenente scarsa bile, fluida e nerastra; *milza* un pò ingrossata, congesta, flaccida

e friabile; *reni* nefritici; *vescica urinaria* contenente circa 100 gr. di urina, limpida, ma albuminosa.

Diagnosi anatomica: febbre gialla.

Analisi chimica del sangue: urea = 1.26 $^0/_{00}$.

Ricerche bacteriologiche. — Le culture praticate, come sempre, in gran numero e con abbondante materiale, dettero i seguenti resultati: dal *sangue* si ottennero scarse colonie di *colibacillo* e di *stafilococco albo;* dal *fegato* varie colonie di *colibacillo;* dalla *bile* nulla; dall'*urina* molte colonie di *stafilococco aureo, albo* e di *colibacillo;* dal *muco tracheale* un'innumerevole quantità di colonie colibacillari e di un bacterio capsulato.

La ricerca del *bacillo icteroide* rimase perciò, in questo caso, negativa.

*
* *

Le considerazioni che potrebbero farsi intorno ai resultati delle osservazioni che finisco di riportare in tutti i loro particolari, sarebbero assai numerose, soprattutto qualora volessimo affrettare l'interpretazione di quel complesso di sintomi e di lesioni che costituiscono il quadro clinico ed anatomico della febbre gialla.

Ma riserbiamo questo compito al fine delle nostre esperienze, e fissiamo frattanto i seguenti risultati che potrebbero considerarsi come definitivamente stabiliti dal punto di vista etiologico.

Mercè opportuni procedimenti è possibile isolare in gran parte dai cadaveri, di soggetti morti per febbre gialla, un microbio speciale, con caratteri nuovi, ben definiti e tali da renderlo facilmente riconoscibile fra tutti gli altri sinora osservati e descritti.

Siccome questo risultato positivo si verificò con gran pena, durante le attuali ricerche, in 7 casi su 12 (non dovendosi considerare il caso dell'Osservazione III, perchè si trattava già di un convalescente), perciò è supponibile che l'isolamento del microbio specifico della febbre gialla, non debba esser tutto al più possibile che nel 58 $^0/_0$ dei casi.

In qualche raro caso l'isolamento del microbio specifico può ottenersi anche durante la vita.

Le ragioni per le quali non può pretendersi che in ogni caso di febbre gialla si debba isolare il microbio specifico sono facili a comprendersi.

Anzitutto il *b. icteroide*, al principio e durante la malattia si moltiplica assai poco nell'organismo umano, essendo sufficiente (come

vedremo nella seconda parte di questa memoria una piccola quantità di *toxina* per isviluppare nell'uomo il quadro completo e gravissimo della malattia.

In secondo luogo, pare che la *toxina*, sia da sola, sia indirettamente, per mezzo delle profonde lesioni che essa determina sopratutto nelle mucose digestive e nel fegato, faciliti in modo eccezionale infezioni secondarie di ogni natura.

Tali infezioni secondarie possono talvolta assumere il tipo di vere e proprie setticemie a *colibacillo*, a *streptococco*, a *stafilococco*, ecc. capaci di uccidere di per sè sole il paziente, come è supponibile sia avvenuto nelle Osservazioni VI, VII, XI e XIII.

Altre volte possono presentarsi in associazione mista così molteplice, per cui, oltre il danneggiare od eliminare addirittura i microbi specifici, i quali come vedremo altrove, sono molto sensibili ai fenomeni di antagonismo, possono infine, soprattutto durante il periodo agonico, trasformare l'infermo in una vera cultura di quasi tutte le specie microbiche intestinali, come forse è accaduto nell'Osservazione I e X.

In ogni modo disturbano sempre, anche nei casi bacteriologicamente più puri, la ricerca del microbio specifico, giacchè questo ultimo non si trova mai solo nell'organismo.

Abbiamo infatti veduto che anche nelle Osservazioni II, VIII, IX e XI, le quali possono considerarsi come le più pure dal punto di vista bacteriologico, fu constatata sempre nel parenchima renale la presenza rispettiva del *colibacillo*, dello *stafilococco aureo* e di altri microbi indeterminati.

Questa tendenza alle invasioni microbiche secondarie, durante l'intossicazione amarilla, è così straordinariamente pronunciata che, come vedremo più tardi, può anche osservarsi non solo nelle affezioni sperimentali degli animali, ma ancora nelle intossicazioni sperimentali ottenute nell'uomo.

Deve quindi concludersi che, ad eccezione di alcuni rari casi, come quello delle osservazioni II, VIII, nei quali il *b. icteroide* fu ritrovato nell'organismo in molta quantità ed allo stato di relativa purezza, la ricerca e l'isolamento del microbio della febbre gialla presenta in generale difficoltà tecniche molto maggiori di quelle che siamo abituati a riscontrare nelle altre malattie acute.

Finalmente, essendo risultato dalle nostre ricerche che il *b. icte-*

roide trovasi nel sangue circolante e nell'interno dei tessuti e che non si riesce mai a porlo in evidenza nel contenuto gastro-intestinale, deve ritenersi, contrariamente a quanto si suppone oggidì, che il *virus* della febbre gialla non risieda nel tubo digestivo e perciò che il suo veleno, anzichè assorbirsi attraverso le pareti intestinali, sia fabbricato nell'interno degli organi e nel sangue medesimo.

In altri termini: il processo infettivo e tossico della febbre gialla, presenterebbe molte analogie con quello che io ho già segnalato nella febbre tifoide (1).

Le ulteriori ricerche sperimentali, dimostreranno infatti più tardi che la imponente e caratteristica fenomenologia intestinale della febbre gialla, è dovuta esclusivamente alle proprietà vomitive, necrosanti ed emorragipare della toxina specifica, fabbricatasi e circolante nell'organismo.

III.

Ricerca del microbio della febbre gialla nei tessuti e descrizione delle principali lesioni anatomiche prodotte nell'uomo dalla infezione amarilla.

Da quanto abbiamo ora terminato di esporre risulta chiaro, come debba essere un po' difficile, *a priori*, la ricerca del *b. icteroide* nei tessuti e con quale incertezza debbansi inoltre accogliere le conclusioni di coloro che hanno descritto delle lesioni istologiche riscontrate nei vari organi, considerandole come dovute esclusivamente all'azione dell'agente specifico della febbre gialla.

Siccome nella maggior parte dei casi questa malattia finisce con una infezione generale mista, talora gravissima, durante la quale

---

(1) Siccome mercè l'impiego della gelatina Elsner, recentemente introdotta nella pratica, soprattutto per la ricerca del bacillo di Eberth nelle deiezioni dei tifosi, quest'ultimo vi può essere più agevolmente dimostrato che per l'innanzi, così vari autori, e soprattutto Funck (La sérothérapie de la Fièvre Typhoide; Bruxelles 1895), si son creduti autorizzati a ristabilire l'antica sede intestinale del virus tifoso, contro la quale si erano pronunciati i risultati delle mie precedenti ricerche.

Però io credo abbastanza giustificate tali conclusioni: 1° perchè si è trovato

assumono una parte, indubbiamente assai attiva, alcuni microbi patogeni che noi conosciamo già come capaci di provocare gravi alterazioni istologiche negli organi invasi, così è chiaro che praticare l'esame istologico dei tessuti senza conoscere il reperto bacteriologico dell'autopsia, equivale ad esporsi a descrivere lesioni dovute indubbiamente a veleni microbici di differente natura.

La medesima obbiezione vale anche per quel che riguarda la ricerca dei microbi specifici.

Ciò spiega infatti perfettamente i risultati discordi o gl' insuccessi ottenuti da vari osservatori i quali si accinsero alla ricerca dei microbi nei tessuti, richiamando successivamente l'attenzione sopra varie forme bacteriche (streptococchi, diplococchi, streptobacilli di Lacerda e Babes, di Sternberg, etc.) le quali molto probabilmente non hanno avuto mai, alcun rapporto specifico con la febbre gialla.

Per conseguenza, tutte queste ricerche debbono riprendersi di nuovo e soprattutto debbono condursi secondo un procedimento, il quale, nel medesimo tempo che ci assicuri un risultato positivo, ci garantisca da ogni possibile equivoco.

Questo procedimento consiste nella scelta di quegli organi i quali al reperto bacteriologico precedente, risultarono contenere il *bacillo icteroide* in una certa quantità ed allo stato di assoluta purezza.

Come possiamo desumere dalle nostre osservazioni, i casi di febbre gialla che presentano i suddetti requisiti, sono tutt'altro che facili ad incontrarsi. Io ne ho avuto un sol caso (Oss. II) e sono debitore ad una fortunata previdenza, del possedere tutti gli organi raccolti all'autopsia e conservati in modo da permettermi ogni sorta di ricerche.

In questo caso infatti io riscontrai il *bacillo icteroide* in gran

---

che nemmeno il procedimento di Elsner dà risultati positivi, costanti; 2°, perchè il fatto stesso di ritrovare nell'intestino il bacillo di Eberth in maniera incostante in numero effettivamente molto scarso, non può considerarsi come una prova ed in favore del suo *habitat* intestinale; 3°, perchè è oramai noto che in tutte le malattie infettive, generali ed acute i microbi specifici possono eliminarsi con estrema facilità dall'organismo, non solamente attraverso ai reni, ma ancora attraverso a tutte le mucose in generale e attraverso quella intestinale in ispecie, sopratutto allorchè quest' ultima, come avviene precisamente nella febbre tifoide, è profondamente alterata per effetto della toxina specifica circolante nell'organismo.

quantità ed allo stato di assoluta purezza. Solamente dal rene, isolai, come è noto, qualche rara colonia di *colibacilli*.

Sono stati gli organi di questo cadavere, fissati dapprima in sublimato e poscia induriti in alcool, che mi hanno servito per la ricerca dei microbi nei tessuti.

In quanto allo studio delle lesioni istologiche, mi sono valso di organi convenientemente fissati in liquido di Flemming.

Nella seguente rassegna sommaria delle fini alterazioni anatomiche da me riscontrate nella febbre gialla, non pretendo naturalmente di affrontare il grave cómpito della isto-patologia di questa infermità, ma solo di porre bene in rilievo la natura e la sede anatomica delle lesioni, il più strettamente specifiche, affinchè tali conoscenze possano utilizzarsi nell'apprezzamento dei risultati che andremo segnalando negli studi ulteriori intorno alla patologia comparata del *bacillo icteroide*.

Gli organi che nella febbre gialla forniscono il contingente anatomo-patologico più interessante, sono rappresentati in ordine di gravità e di importanza: in prima linea dal fegato, quindi dai reni, in seguito dal canale digestivo ed in ultimo dalla milza.

Cominciamo dallo studio del *fegato*.

In quasi tutti i casi il fegato è di volume presso a poco normale e conserva la sua consistenza abituale; eccezionalmente questa consistenza sembra alquanto aumentata.

Riguardo al colore, esso assume una tinta giallastra, comparabile al cuoio nuovo, al caffè-latte, alla gomma gutta, alla foglia morta, ecc. In alcuni casi questa tinta è poco uniforme e si alterna con chiazze livide, rossastre o ardesiache, soprattutto allorquando esiste una congestione venosa.

Al taglio fuoriesce sempre poca quantità di sangue solamente dai grossi vasi, perchè il tessuto è anemico, pallido e quasi disseccato, come se avesse subìto un principio di cottura.

Un esame accurato fa risaltare immediatamente una stasi sanguigna dei vasi perilobulari, che a tutta prima potrebbe far credere a quella lesione che va sotto il nome di *fegato noce moscata;* malgrado ciò una differenza capitale separa questi due stati: nel *fegato moscato* la stasi esiste nelle vene centrali, mentre che nel *fegato amarillo* la parte giallastra corrisponde al centro del lobulo e la congestione alle vene periferiche.

Ciò costituisce quella lesione caratteristica della epatite infettiva che Hanot ha chiamato con espressione felice; *fegato noce moscata intervertito.*

Dal punto di vista istologico interessano le lesioni vascolari e cellulari

Riguardo ai *vasi* si osserva nelle sezioni, che le vene perilobulari appartenenti al sistema della porta, si presentano distese e ripiene di sangue, in mezzo a cui trovansi molti ammassi irregolari di pigmento disposto a blocchi. Soventi la *vena porta* presenta l'endotelio ispessito, rigonfio, desquamato o ricolmo di granulazioni grasse: la parete è pure ispessita, contiene dei nuclei embrionarii, e nel suo spessore si osserva quasi sempre un alto grado di infiltrazione leucocitaria.

I *capillari* presentano frequenti e profonde alterazioni irregolarmente distribuite nel tessuto epatico. D'ordinario il loro rivestimento endoteliale è rigonfio, torbido e molte cellule endoteliali non lasciano più colorare il loro nucleo, ciò che significa uno stato di necrosi della cellula stessa.

In alcuni punti infatti, i capillari trovansi assai dilatati e ripieni di sangue; in altri appaiono sfiancati addirittura, per cui ne deriva la rottura delle pareti e quindi delle infiltrazioni emorragiche assai estese e frequenti, che occupano porzione del lobulo o lobuli intieri. In altre parti però è facile rilevare l'ischemia e quasi la scomparsa delle trabecole capillari, imputabile alla esagerata compressione degli elementi cellulari ed alla dislocazione più o meno accentuata della travatura epatica che si verifica su zone assai estese del parenchima.

Ma le lesioni delle *cellule epatiche* sono quelle che possono interessarci più da vicino, inquantochè costituiscono il fatto anatomico ed istologico più saliente della intossicazione amarilla.

All'infuori dell'avvelenamento da fosforo, non esiste infatti che la febbre gialla, in cui gli elementi del *fegato sano* possano distruggersi con tanta rapidità.

Ciò che colpisce anzitutto l'attenzione, allorchè si osserva a piccolo ingrandimento la sezione di un fegato ammalato, colorato con ematossilina o con carminio, è la esistenza di molteplici focolai di infiltrazione parvicellulare e di numerose zone, nelle quali la caratteristica *travatura epatica* è scomparsa e l'elemento dell'organo è deformato, compresso, sminuzzato o degenerato in una

massa informe di residui nucleari, di globuli sanguigni, di pigmento e di granuli grassi.

Riguardo al *protoplasma*, il fatto comune, indistintamente legato, come un fenomeno specifico, al reperto della febbre gialla, è la sua *degenerazione grassa*.

Questa degenerazione può apparire più o meno intensa, a seconda delle varie parti del parenchima, ma colpisce ad un tempo e quasi senza eccezione tutti gli elementi cellulari. Essa è assai ben visibile a fresco; soprattutto se si ha cura di dilacerare la polpa epatica in cloruro sodico, con l'aggiunta di una goccia di soluzione osmica.

Nelle sezioni fissate con liquido di Flemming, appare in molti casi ed in alcuni punti talmente grave, che non è più possibile distinguere la struttura del tessuto che si ha sotto gli occhi.

Infatti le goccioline di grasso colorate dall'acido osmico non sempre sono contenute nell'interno del protoplasma cellulare, ma bene spesso, forse per effetto di una distruzione del medesimo, si rendono libere, si distribuiscono irregolarmente fra gli altri elementi come una miriade di granulazioni nere, oppure si fondono insieme e costituiscono delle grosse macchie nere, grandi talvolta quanto la stessa cellula epatica.

Allorquando il processo degenerativo è giunto a tale stato di intensità, lo studio delle fini alterazioni istologiche del tessuto .epatico è affatto impraticabile nei pezzi fissati con acido osmico, e perciò è più conveniente praticare delle sezioni nei pezzi fissati in sublimato e induriti in alcool.

Queste sezioni si colorano con ematossilina, o più vantaggiosamente ancora col metodo Martinotti alla safranina, acido cromico (vedi: *Zeitschr. für Wiss. Mikrosk.* 1887. Bd. IV, p. 326).

In tal caso la prima ispezione del preparato dimostra immediatamente, oltre alle alterazioni d'insieme più sopra descritte, le fini lesioni istologiche inerenti alla cellula epatica.

Questa mostrasi sempre con protoplasma torbido, granuloso, tumefatto, cosparso sovente di pigmento giallo-bruno o giallo-verdastro e di un aspetto trabecolare più o meno sviluppato, che sta a rappresentare il grado di metamorfosi adiposa subìto dalla cellula.

In molti punti la *travatura epatica* è quasi dissociata e un certo numero di cellule incontrasi atrofizzato.

In quanto ai *nuclei*, può dirsi in una maniera generale ch'essi sono meno colorabili che d'ordinario, per cui in alcuni casi, pur rimanendo perfettamente e nettamente visibili i loro contorni, non si colorano affatto.

Sarebbe difficile stabilire sino a qual punto questi fatti possano rientrare nel campo della necrosi cellulare e se debbano considerarsi come espressione di una necrosi ialina o da coagulazione, cui avrebbero soggiaciuto gli elementi così alterati. Ad ogni modo è indubitato che tale alterazione nucleare comune significa che la vitalità degli elementi epatici è fortemente compromessa.

Non ho mai incontrato nuclei con modificazioni cromatiche tali da potersi interpretare come fatti di cariocinesi. È vero che assai spesso trovansi nuclei alquanto più voluminosi degli altri, a contenuto chiaro ed omogeneo, con scarsa cromatina, d'ordinario respinta verso la periferia; ma evidentemente la modificazione subìta da questi nuclei è piuttosto da ascriversi ad un fenomeno di *idrope cellulare*, anzichè ad un indizio di mitosi.

Oltre a questi nuclei idropici, trovansi in gran quantità nuclei assai più piccoli del normale, quasi atrofizzati, ma sul cui significato morfologico è difficile pronunciarsi.

Veniamo ora ai microbi.

Ho già detto più sopra in quali condizioni la loro ricerca può dare un risultato non solo attendibile, ma positivo. Aggiungo anche *positivo*, giacchè pure in quei casi nei quali le culture dimostrano l'assenza di infezioni secondarie, il *bac. icteroide* trovasi così poco diffuso da renderne oltremodo difficile la ricerca. Ciò è infatti dimostrato dal reperto bacteriologico del cadavere, che talvolta è totalmente negativo.

Già posto in guardia contro questa eventualità che era stata segnalata da vari autori, e sopratutto da Gibier, Sternberg, ecc., sin dalle prime autopsie di orientazione non solamente cominciai a fissare ed a conservare tutti gli organi in differenti miscele, ma pensai di porre altresì per 12 ore nella stufa a 37° dei grossi frammenti di tessuto epatico, previamente lavati all'esterno con sublimato e sospesi per un filo in una camera umida, onde favorire artificialmente la moltiplicazione dei pochi microbi che eventualmente vi fossero stati presenti in quantità troppo scarsa, per poter essere isolati o ricercati con esito per mezzo del microscopio.

Questa misura di previdenza, come vedremo più tardi, mi è stata infatti di grande utilità, inquantochè mi ha concesso di stabilire esattamente la sede e la via di diffusione del *bac. icteroide*, sovratutto nel parenchima epatico,

In questo organo i microbi non trovansi in quantità molto abbondante, occorre esaminare attentamente ed a lungo le preparazioni colorate col metodo di Nicolle, per poterli rintracciare in qualche ansa capillare, ove si osservano sempre riuniti in gruppetti più o meno numerosi.

Tale tendenza a riunirsi in gruppi nell'interno dei vasi costituisce una disposizione caratteristica del *bac. icteroide* in tutte le sue localizzazioni nei parenchimi dei vari organi. Oltre che nel fegato, la vedremo infatti ripetersi nella milza, nei reni, ecc., ove ben eccezionalmente è dato rintracciare dei microbi affatto isolati.

Ciò fa supporre subito che la febbre gialla sia un'infezione del sangue e che la moltiplicazione dei microbi specifici si effettui prevalentemente nell'interno dei capillari, sopratutto in corrispondenza delle loro insenature o delle loro biforcazioni, ove i microbi stessi trovano più facilmente maniera di arrestarsi e di colonizzare.

Una dimostrazione assai netta di ciò noi la troviamo esaminando le sezioni di fegato rimasto nella stufa a 37°, durante dodici ore. È chiaro che in questi frammenti di fegato verificasi *post-mortem* un'abbondante proliferazione dei microbi specifici, precisamente come avviene nella polpa splenica dei tifosi, cui si fa subire lo stesso trattamento, ogni qualvolta si voglia rendere più facile la ricerca e l'isolamento del bacillo di Eberth. Esaminando infatti le sezioni di questo fegato a piccolo ingrandimento, si osservano dei distretti capillari affatto riempiti di microbi ivi ammassati e stipati in maniera tale che nel loro insieme riproducono la forma dei capillari stessi, o più precisamente delle loro biforcature, in corrispondenza delle quali pare si effettui, come ho già detto, la colonizzazione e la proliferazione metastatica dei germi.

L'aspetto che essi assumono nei tessuti è identico a quello che si osserva nelle culture, se non che il loro protoplasma non sempre si trova intensamente ed uniformemente colorato in azzurro, ma presenta una struttura un po' granulosa e trasparente, soprattutto nelle parti più centrali.

Nemmeno nel fegato soggiornato nella stufa si trovano mi–

crobi isolati fra le cellule, lungi dai piccoli focolai endovasali. Ciò conferma sempre più la idea già espressa, che cioè la profonda steatosi diffusa a tutte le cellule epatiche deve ascriversi all'azione diretta, non dei microbi, ma di un veleno potente da essi medesimi fabbricato.

Dopo il fegato, l'organo che nella febbre gialla risulta più gravemente e con maggior frequenza colpito è senza dubbio il *rene*. Le note microscopiche sono sempre quelle della nefrite acuta parenchimatosa od emorragica. Istologicamente partecipano all' affezione tanto i glomeruli quanto l'epitelio dei canalicoli urinari.

Le alterazioni del glomerulo non differiscono da quelle che soglionsi riscontrare nella glomerulo-nefrite infettiva comune. Lo spazio capsulare contiene quasi sempre del secreto albuminoso, già coagulato e di aspetto granuloso, contenente spesso degli elementi epiteliali necrotici, delle masse sferiche ialine e dei globuli sanguigni. I vasi dei glomeruli sono straordinariamente iperemici e presentano spesso l'endotelio degenerato in grasso o desquamato.

In quanto all'epitelio dei canalicoli urinari, esso si osserva in vari punti completamente torbido, granuloso, degenerato o necrotico; i nuclei sono di aspetto normale, ma han perduto molto spesso la capacità di colorarsi; il lume dei canalicoli urinari contiene frequentemente delle masse coagulate, dei cilindri ialini e granulosi formati da albumina trasudata.

Il tessuto connettivo interlobulare partecipa poco al processo, ma talora si trova edematoso od infiltrato; i vasi sanguigni interlobulari appaiono in generale iperemici ed in alcuni punti dilatati, sfiancati e talora rotti del tutto.

La ricerca dei microbi nelle sezioni del rene, presenta difficoltà presso a poco uguali a quelle che abbiamo già segnalato nel fegato e che son dovute al loro numero assai scarso. Malgrado ciò si può riuscire sempre a trovare qualche piccolo focolaio metastatico che è situato regolarmente in corrispondenza di una sezione vasale. Poichè, tanto per il loro numero come per la loro disposizione, questi piccoli accumuli di bacilli sono perfettamente identici a quelli che abbiamo descritto nel parenchima epatico, ond' è affatto inutile soffermarci oltre a loro riguardo.

Un altro organo, la *milza*, che in generale assume una parte considerevole fra le lesioni anatomiche che accompagnano quasi

tutte le malattie infettive, risulta invece poco compromesso nella febbre gialla. Per lo più è di volume normale, di rado è alquanto ingrossata. Ciò non deve tuttavia costituire un fatto eccezionale, come taluni pretendono, giacchè anche in altra malattia, per eccellenza infettiva e tossica, la difteria, la milza è sempre di volume normale o di poco aumentata in volume. Oltre a ciò, come può rilevarsi dalla comparazione fra il protocollo delle autopsie ed il loro rispettivo reperto bacteriologico, non esiste alcun rapporto fra il lieve aumento dell'organo, che talora si riscontra indubbiamente, e la eventuale coesistenza di una infezione mista, cui *a priori* potrebbe imputarsi l'aumento suddetto.

Nella Osservazione II, in cui la milza presentò allo stato di purezza *bacillo icteroide*, l'organo era alquanto ingrossato e per altro lato l'anamnesi della vittima escludeva ogni antecedente malarico.

In altri casi invece (Osservazioni I, VII, VIII, X, XI), malgrado si trattasse di infezioni miste, o di vere e proprie setticemie a streptococco, la milza risultò affatto normale.

Questa circostanza, che a tutta prima sembra assai strana, è forse dovuta al fatto che la sola toxina amarilla non è capace di determinare una notevole tumefazione di milza e che questa si verifica solo allorquando il bacillo specifico, moltiplicatosi e diffuso per ogni dove, si localizza nell'organo in grande quantità.

In quanto allo strano reperto negativo del tumore di milza nei casi che finiscono con infezioni miste o con setticemie secondarie, esso può spiegarsi facilmente riflettendo che tali infezioni secondarie si manifestano sempre all'ultima ora ed hanno un decorso così fulminante, che non può dar tempo ad alcun fenomeno reattivo notevole per parte del sistema linfatico.

Dallo studio di varie milze da me esaminate è infatti risultato che la tumefazione che talora si osserva in quest'organo è dovuta in massima parte alle abbondanti emorragie parenchimali della polpa splenica. Queste emorragie interstiziali sono molto comuni nella febbre gialla e talora assumono così vaste proporzioni che non si distinguono più nè le lacune venose della polpa, nè il fine reticolo adenoide; ma sotto al microscopio appaiono larghe zone emorragiche, in mezzo alle quali si trovano delle masse amorfe ialine, che sembrano prodotti di coagulazione.

In quanto ai vasi si rileva spesso una infiltrazione parvicellulare

assai spiccata, intorno alle guaine linfatiche che accompagnano i rami arteriosi maggiori.

Negli elementi della polpa non ho osservato nè forme di cariocinesi, nè alterazioni nucleari meritevoli di fissare l'attenzione.

I follicoli, quando si riesce a ritrovarli nel parenchima, non sembrano alterati.

La colorazione dei microbi specifici nel tessuto splenico la ho praticata solamente nella milza appartenente al caso num. 2, che risultò contenere il microbio specifico allo stato di assoluta purezza. La loro ricerca non è difficile, essi trovansi infatti relativamente molto difiusi, soprattutto in corrispondenza dei focolai emorragici parenchimali ove si osservano, come negli altri organi, riuniti in gruppetti più o meno numerosi, aventi il medesimo carattere già più sopra segnalato.

Uno speciale riguardo dal punto di vista istologico, meriterebbero infine le lesioni del tubo gastro-intestinale, giacchè è verso quest'organo che vien richiamata prevalentemente l'attenzione di tutti. Noi ce ne occuperemo in breve e solo per quel tanto che possa aiutarci nella ulteriore interpretazione delle funzioni tossiche del veleno amarillo.

Infatti, dopo avere escluso, in base ai risultati delle nostre ricerche bacteriologiche, il concetto dominante relativo alla *sede gastrica* (1) del virus amarilligeno, e dopo aver segnalato la sua presenza nello stesso sangue circolante, è naturale debba ricercarsi la causa delle gravi lesioni della mucosa digestiva, che danno un carattere sintomatologico ed anatomico così saliente alla febbre gialla, in un processo infiammatorio ematogeno.

Non in tutti i casi di febbre gialla lo stomaco è gravemente alterato. Come abbiamo già stabilito riguardo al meccanismo di un'altra malattia specifica a lesioni intestinali, la febbre tifoidea (2), queste ultime possono manifestarsi con maggiore o minore inten-

(1) Questo concetto che sembra accettato quasi senza discussione fra gli autori più seri che si sono occupati della febbre gialla (Sternberg, Gibier, Jones, ecc.) è stato anche ultimamente sostenuto di nuovo da un distinto scienziato brasiliano, il dott. J. B. de Lacerda (ved. *Os rins na febre amarella*, Rio de Janeiro, 1896, p. 6).

(2) Vedi « Etudes sur la fièvre typhoïde expérimentale », 3me Mémorie (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1894, pag. 353).

sità a seconda della sensibilità della mucosa all'azione del veleno specifico.

Molto probabilmente il medesimo fatto si verifica nella febbre gialla, in quanto che a fianco di casi nei quali il canale digestivo risulta profondamente alterato, se ne osservano altri che clinicamente e anatomicamente possono decorrere con sintomi morbosi gastro-intestinali relativamente assai miti, tanto è vero che lo stesso *vomito nero* (gastrorragia), che può considerarsi come un sintomo caratteristico della malattia, talvolta può mancare del tutto ed essere sostituito durante tutto il corso della medesima da un vomito bilioso, simile a quello che si osserva nelle comuni febbri biliose malariche.

Le principali alterazioni istologiche rilevate nelle sezioni di stomachi profondamente alterati, come per es. quelle delle Oss. I e V, sono le seguenti: la superficie della mucosa è ricoperta da un'abbondante patina che risulta costituita da muco, cellule epiteliali in degenerazione mucosa, da globuli rossi e da leucociti.

L'epitelio cilindrico dei condotti escretori delle ghiandole gastriche risulta assente o colpito in differente grado da metamorfosi mucosa. L'epitelio delle ghiandole peptiche presenta delle alterazioni che riguardano per lo più le cellule adelomorfe, che mostransi rigonfiate, torbide, degenerate o ridotte in ammassi granulosi; mentre le cellule delomorfe (di rivestimento) sembrano più resistenti e conservano il loro aspetto e la loro ubicazione normali.

Ma quelle che dominano sovrattutto all'esame istologico della mucosa gastrica sono le lesioni vascolari.

Infatti, tanto i vasi della sottomucosa come l'intreccio dei capillari che imprigiona tutte le ghiandole gastriche, si presentano straordinariamente sopraccarichi di sangue ed il tessuto connettivo interglandulare è sede di infiltrazioni linfatiche e di emorragie numerose ed abbondanti.

In questi ultimi tempi, qualche autore ha accennato alla esistenza di una grave degenerazione grassa dei vasi capillari dello stomaco, cercando di spiegare con ciò la facile rottura e quindi la frequenza delle gastrorragie negli ultimi periodi della febbre gialla. Quantunque le mie osservazioni si appoggino sopra un numero limitato di casi, tuttavia debbo dichiarare che questa degenerazione grassa dei capillari dello stomaco non rappresenta nè un fatto costante, nè un'alterazione così grave come si vorrebbe far credere.

D'altro canto non è difficile comprendere la genesi delle emorragie capillari che caratterizzano il quadro morboso della febbre gialla, dal momento che le funzioni emorragipare già scoperte e studiate a riguardo di certi microbi (*colibacillo*, *streptococco*, *piocianeo*, *bac.-tifico* etc.), sono da per sè in grado di darcene una spiegazione completa.

Vedremo infatti a suo tempo, come la proprietà di determinare congestioni vasali ed emorragie sia un càrattere saliente del veleno fabbricato dal *bacillo icteroide.*

Oltre a ciò, siccome l'ultimo periodo della febbre gialla è quasi costantemente caratterizzato dalla invasione nell'organismo per parte del *colibacillo*, degli *streptococchi* etc., è chiaro che le funzioni di tutti questi microbi eminentemente emorragipari debbano spesso accumularsi, determinando, a seconda dall'attività delle toxine e a seconda della resistenza degli organi, manifestazioni emorragiche di varia intensità per parte delle mucose in generale e di quella gastrica in particolare.

IV.

Morfologia e biologia del bacillo icteroide.
Diagnosi bacteriologica rapida del medesimo.

Il microbio, cui abbiamo posto il nome di *bacillus icteroides*, si coltiva facilmente su tutti i comuni mezzi nutritivi artificiali, solidi e liquidi, nei quali si presenta sotto l'aspetto di un bastoncino ad estremità arrotondate, per lo più riunito in coppia, lungo da 2 a 4 micromillimetri ed in generale due volte più lungo che largo.

Questa forma però non è sempre costante, e come quella di molti altri microbi, varia incessantemente, entro certi limiti, a seconda del mezzo nutritivo, della età, etc., come andremo descrivendo in seguito.

Si colora facilmente con tutti gli usuali liquidi coloranti, ma non resiste al metodo di Gram.

La colorazione delle ciglia, ottenuta secondo il procedimento di Nicolle-Morax, dimostra la presenza di molteplici (4-8) e lunghe ciglia vibratili. Col metodo di Legal-Weyl ($Fe_2\ Cy_{10}\ (NO)_2\ Na_4 + KOH + C_2\ H_4\ O_2$) non si ottiene la reazione *bleu* dell'indolo; col metodo di Kitasato ($NO_2\ K + H_2\ SO_4$) la si ottiene debolmente.

Culture su mezzi solidi.

1. Culture piatte in gelatina.

Lo sviluppo in colonie distinte alla superficie o nello spessore, delle placche di gelatina, costituisce per il *bacillo icteroide* un elemento diagnostico di grande valore.

Mantenendo le culture alla temperatura di circa 16°-20°, già dopo 24 ore sono visibili a piccolo ingrandimento (60 diametri) delle colonie puntiformi dell'aspetto e della dimensione dei leucociti del sangue. Infatti esse sono rotondeggianti, trasparenti, incolore, senza nucleo e costituite da una granulazione assai fine e brillante.

Non fluidificano mai la gelatina.

Allorquando le colonie sviluppate in una piastra sono assai abbondanti e ravvicinate fra loro, esse arrestano ben presto e per sempre il loro accrescimento, però il loro aspetto non si mantiene sempre identico e per lo più dopo 6-7 giorni, cominciano ad opacarsi e finiscono talora col trasformarsi in altrettanti punti neri, affatto impenetrabili alla luce.

Se al contrario le colonie si sviluppano in superficie e alquanto distanti fra loro, seguitano ad aumentare di volume e si fanno sferiche mantenendo sempre il loro aspetto brillante e granuloso.

A poco a poco comincia inoltre ad apparire quasi sempre un nucleo più o meno oscuro, più o meno grande, centrale od eccentrico, ma sempre circondato da un piccolo alone chiaro, da cui partono le fini granulazioni che si diffondono verso la periferia, ove si perdono regolarmente in una delicatissima ed elegante sfumatura.

Giunta a questo punto, cioè circa al 5° giorno, la colonia presenta un aspetto talmente caratteristico che, dopo conosciuto, difficilmente potrebbe dimenticarsi.

Anche osservate ad occhio nudo, le colonie appaiono a luce diretta, di un aspetto latteo, senza iridescenza, ed alla luce riflessa con un colore grigio cereo.

Per trasparenza si distingue inoltre assai bene e ad occhio nudo il piccolo nucleo, a causa della sua perfetta opacità.

Molte volte le colonie non sono regolarmente sferiche, ma sono depresse da un lato, ove si forma una specie di ilo che dà ricetta-

colo al nucleo. In questo caso la colonia assume una figura reniforme assai caratteristica.

In casi eccezionali la superficie della colonia non è costituita da quelle finissime, uniformi e brillanti granulazioni, che abbiamo più sopra descritte, ma assume una elegante disposizione radiolare e ondulata che divergendo dal centro finisce perdendosi regolarmente alla periferia in una lievissima ed impercettibile sfumatura.

L'aspetto di queste colonie radiolari atipiche è così diverso da quello comune suddescritto, che è necessario conoscerlo bene, affine di evitare possibili e facili errori di diagnosi.

Anche quel piccolo centro germinativo, opaco, cui diamo volgarmente il nome di *nucleo*, della colonia, non sempre rimane di forma sferica, ma assume assai spesso, soprattutto allorquando è situato in corrispondenza della insenatura di una colonia reniforme, la figura di una sfera situata in mezzo ad un cerchio (come la nota figura del pianeta di *Saturno*) e risalta in modo particolare per il suo aspetto nero. Raramente possono inoltre trovarsi delle colonie senza nucleo o recanti due nuclei eccentrici.

Qualunque sia però la figura assunta dalla colonia durante il proprio sviluppo, di regola essa non permane a lungo dell'aspetto indicato. A misura che invecchia, cioè a cominciare dal 5° o 6° giorno, comincia a poco a poco ad offuscarsi l'aspetto brillante della sua granulazione, diviene opaca, manda riflessi nerastri e finisce col divenire nera del tutto, presentando solo una piccola zona rotonda e trasparente in mezzo alla quale si disegna ancora con perfetta nettezza il piccolo nucleo.

Quando si tratta di colonie sviluppate nello spessore della gelatina anzichè alla superficie, l' opacamento si effettua molto più presto, ed osservate a piccolo ingrandimento appaiono allora come piccole sfere di color nero, quasi fossero delle gocce d' inchiostro.

Questa speciale tendenza delle colonie all'opacamento più o meno completo, costituisce un altro elemento di valore per segnalare nelle culture in gelatina il *bacillo icteroide* in mezzo agli altri microbi che eventualmente si fossero sviluppati a suo lato. Però è necessario avvertire a questo punto, che non sempre le colonie che vanno sviluppandosi in gelatina presentano il tipo morfologico fondamentale ora descritto. Ho osservato infatti con una certa frequenza soprattutto in alcune placche di gelatina nelle quali, o per effetto di temperature

disgenesiche o per altre cause sconosciute e inerenti al microbio, lo sviluppo delle colonie si compiva assai tardivamente e con una certa difficoltà, presentarsi queste ultime fin da principio con figure completamente atipiche, tanto per l'aspetto come per il colore. Queste figure atipiche compaiono talvolta anche in certe culture che si sono sviluppate normalmente od allorquando esse cominciano ad invecchiare (1).

In questo ultimo caso, dopo circa 8-10-20 giorni di vita, le colonie cominciano a subire una lenta e graduale trasformazione, assumono una tinta giallognola o brunastra, dispongono la loro superficie a strati od anelli concentrici, formano dei disegni a rosetta, a cespuglio, a mandorla, compaiono delle variegature, dei nuclei stellati, degli intrecci reticolari, insomma danno luogo a una serie di figure talmente strane e fantastiche, che non è possibile descriverle dettagliatamente.

Non v' ha dubbio che questo strano pleomorfismo, soprattutto per i non esperti, potrebbe esser causa di facili confusioni, in ispecial modo con colonie appartenenti alle numerose varietà del *coli-bacillo*, qualora lo studio delle culture per l'isolamento del *bacillo icteroide* non venisse effettuato nelle condizioni più propizie al suo normale sviluppo.

È perciò che in una serie completa di ricerche comparative ho voluto fissare alcuni caratteri differenziali, suscettibili di essere utilizzati rapidamente.

I risultati delle suddette ricerche furono i seguenti:

1° Lo sviluppo del *bacillo icteroide* sulle placche di gelatina, deve ottenersi possibilmente ad una temperatura non inferiore ai 20° C.

---

(1) Credo conveniente di accennare a questo punto che la suddetta descrizione morfologica data dalle mie prime osservazioni.

I miei studi successivi mi hanno dimostrato che la vita di laboratorio induce dei cambiamenti, talora assai profondi, nella fisonomia originale delle *colonie icteroidi* sviluppate sulla gelatina.

Delle ricerche ulteriori potranno stabilire fin dove si può arrivare con questo *pleomorfismo di laboratorio*.

Frattanto io credo che la descrizione morfologica suddetta sia, a tutto rigore, solamente applicabile ai microbi recentemente isolati dall'ammalato di febbre gialla o dal suo cadavere.

2° Allorquando per una causa qualsiasi, lo sviluppo regolare delle colonie alla superficie della gelatina, non cominci ad effettuarsi dopo le prime 36-48 ore deve sospettarsi la eventualità di uno sviluppo atipico tardivo.

3° Questo pleomorfismo tardivo del *bacillo icteroide*, deve considerarsi come la conseguenza di un fenomeno di natura involutiva e che si distingue dal pleomorfismo presentato dalle colonie del *colibacillo*, giacchè quest'ultimo lo presenta costantemente e in condizioni normali.

Infatti ho voluto seguire attraverso a varie generazioni sviluppatesi successivamente alla superficiè della gelatina, cinque varietà di *colibacillo*, isolate dallo stomaco e dallo intestino di soggetti morti di febbre gialla.

Inizialmente queste 5 varietà presentavano delle figure un poco distinte le une dalle altre, ma già nelle prime generazioni riprodotte nella gelatina, cominciarono a mostrarsi delle colonie pleomorfe e affatto diverse dai tipi primitivi. Queste nuove colonie vennero successivamente trasportate in altre placche e ad ogni nuova generazione si riprodussero delle figure sempre nuove, sempre più strane e costantemente diverse non solo dal tipo di partenza, ma anche da quelle medesime sviluppatesi contemporaneamente o in successivi periodi nella placca comune.

4° Un carattere differenziale invariabile, che può servire costantemente e precocemente a distinguere le colonie in gelatina del *bacillo icteroide* da quelle del *colibacillo* è rappresentato dal tono di luce emanato dalle medesime. Il tono di luce emanato dalle colonie del *bacillo icteroide* è sempre *incolore*, cosicchè queste dall'aspetto di leucociti e di grosse cellule a protoplasma finamente granuloso che presentano in principio, divengono a poco a poco opache del tutto, senza assumere giammai quel colore *brunastro-castagno*, più o meno intenso, che caratterizza *indistintamente* tutte le colonie colibacillari, anche nel primo periodo del loro sviluppo.

Questo elemento differenziale è destinato a servire naturalmente nei casi in cui si debba stabilire una diagnosi precoce nelle prime 36-48 ore; giacchè, se si aspetta che le colonie del *bacillo icteroide* germogliate alla superficie della gelatina sieno giunte al loro completo sviluppo, assumendo quell'aspetto sferico o reniforme nucleato, incolore o nerastro o finamente granuloso, più sopra de-

scritto, non è più possibile confusione alcuna con le ben note figure *crateriformi* a « *foglia di vite* », a « *mare di ghiaccio* », etc., presentate dalle innumerevoli varietà del colibacillo.

Del resto vedremo più tardi che, a differenza di quanto si verifica per il cholèra, per il tifo e in varie altre malattie infettive, non è la cultura piatta in gelatina il procedimento migliore per stabilire sollecitamente la diagnosi bacteriologica del *bacillo icteroide*.

2. Culture su gelatina solidificata.

a) *Gelatina solidificata verticalmente* (innesto per infissione).

Le culture ottenute per infissione non presentano nulla di veramente caratteristico. Alla superficie ed attorno al punto d'infissione, il *bacillo icteroide* si sviluppa lentamente, a guisa di una sottile capocchia, quasi trasparente, come una goccia di muco e con poca tendenza ad estendersi.

Talvolta lo sviluppo in superficie rimane affatto rudimentale o manca del tutto. Lungo il tratto d'infissione invece, la via percorsa dall'ago di platino appare nettamente, a guisa di un nastro, costituito da finissime sfere opache, che non confluiscono mai e si presentano più grandi e distinte ai margini e all'estremità inferiore del tratto d'innesto.

b) *Gelatina solidificata obliquamente* (innesto per strisciamento).

Questo genere di cultura risulta oltremodo caratteristico, ma solamente in certe condizioni. Se la seminagione praticata con l'ansa di platino è molto abbondante (come per esempio sarebbe il materiale di una cultura) lo sviluppo si effettua in tutta la superficie del mezzo nutritivo, sotto forma di un sottile strato più o meno iridescente, ma che non presenta nulla di rimarchevole.

Qualora invece si innesti un materiale relativamente scarso di microbi, come per esempio una traccia di sangue o un po' di succo viscerale di un animale morto d'infezione pura, di maniera che lo sviluppo delle colonie possa effettuarsi isolatamente, queste appaiono dopo qualche giorno, come altrettante piccole perle di un aspetto bianco-latteo, senza alcuna iridescenza. Allorquando queste piccole perle hanno raggiunto un certo grado di accrescimento, possono arrestarsi del tutto e rimanere stazionarie per sempre.

Ma per lo più, soprattutto se le colonie trovansi abbastanza isolate fra loro, si verifica un fenomeno che descriveremo con maggiori particolari a proposito delle culture su gelosio, vale a dire che le colonie seguitano a svilupparsi, *colando* verso le parti declivi, e dando luogo alla formazione di vari tracciati sinuosi, che si intersecano e si uniscono in vari punti scendendo verso il fondo del tubo, come altrettanti piccoli rivi di bianca cera brillante.

In tal caso la cultura assume un aspetto così particolare, che non è possibile descrivere al naturale.

Questi piccoli rivi d'aspetto cereo, confluendo verso il basso, raccolgono a poco a poco, nel fondo del tubo, un piccolo deposito di sostanza bianca e lucente. Col tempo si manifestano inoltre in vari tratti del cammino percorso da questi piccoli rivi, delle *venature trasparenti*, che contrastano singolarmente con l'opacità lattea della massa fondamentale e danno l'idea come se una sottile pellicola esterna ed opaca si screpolasse in alcuni punti, per lasciar vedere la massa sottostante, d'aspetto cereo e di una trasparenza perfetta.

3. Culture su gelosio.

A differenza di ciò che si verifica per la maggior parte dei microbi patogeni conosciuti, la cultura su gelosio rappresenta per il *bacillo icteroide*, un mezzo diagnostico di prim'ordine. Però la dimostrazione di questo mezzo diagnostico non risulta efficace se non in determinate condizioni, che andremo subito a stabilire.

Se per mezzo di un ansa di platino o con la estremità di una pipetta Pasteur, contenenti un po' di sangue o un po'di succo splenico o epatico, ricavato dal cadavere di un animale o di un uomo in cui non si sieno manifestate infezioni secondarie abbondanti, si praticano delle seminagioni per strisciamento alla superficie di un tubo di gelosio solidificato obliquamente, e si colloca poscia questo tubo nella stufa a 37° C., si osserva dopo 12-24 ore la comparsa di varie colonie disseminate alla superficie del mezzo nutritivo e più o meno distanti fra loro, a seconda della quantità o del contenuto microbico del materiale seminato. Queste colonie non presentano nulla di rimarchevole. Sono rotondeggianti, di aspetto grigiastro, un pò iridescenti, trasparenti, a superficie liscia, uniforme,

e a margini regolari. Lasciando tuttavia la cultura nella stufa, le colonie seguitano a crescere ancora un poco nella stessa maniera, sinchè arrivate ad un certo punto, rimangono stazionarie come quelle di qualunque altra specie microbica.

Ma se dopo essersi sviluppate per 12-24 ore, od anche più, nella stufa a 37°, le culture si trasportano alla temperatura dell'ambiente di 20°-28°, il successivo accrescimento delle colonie si effettua in maniera così distinta dalla primitiva, che viene subito rimarcata. Infatti, dopo le prime 8-10 ore, si verifica attorno alle primitive colonie sviluppate nella stufa, la formazione di un *cercine*, che si distingue immediatamente per il suo aspetto rilevato, bianco-opaco, a riflessi madreperlacei, e contrasta in maniera nettissima con la parte centrale che rimane sempre piana, iridescente e trasparente.

Questo fenomeno è così evidente che può osservarsi anche alla luce artificiale, ed una volta conosciuto lascia un' impressione singolare e ben definita, per cui il distinguere immediatamente e ad occhio nudo una colonia del *bacillo icteroide*, in mezzo a tutte le altre colonie microbiche sin ora descritte, non è che il risultato di una semplice ispezione superficiale.

Lasciando sempre la cultura alla temperatura dell'ambiente, il *cercine madreperlaceo* seguita a svilupparsi conservando il medesimo aspetto. Ingrossa, si fa più prominente e finisce col circondare la colonia primitiva centrale con una specie di margine ondulato e regolare che si solleva molto al di sopra del suo livello.

Una volta giunte a questa fase di sviluppo, le colonie assumono un aspetto veramente curioso, che potrebbe paragonarsi alla figura di un *suggello di ceralacca* di cui la parte centrale, depressa, trasparente, liscia, lievemente iridescente e perfettamente circolare, è rappresentata dalla colonia sviluppatasi alla temperatura della stufa, mentre il cercine esterno, assai prominente, di una opacità brillante e madreperlacea ed a contorni un po' ondulati, è costituito dalla seconda fase di sviluppo, effettuatosi alla temperatura dell'ambiente.

Allorquando le colonie si sviluppano molto distanti le une dalle altre, ciascuna di esse si svolge indipendentemente e forma il proprio *sigillo* distinto ; se al contrario il materiale seminato fu abbondante e le colonie si svilupparono nella stufa, assai ravvicinate

fra loro, i cercini esterni sviluppati in seguito, alla temperatura dell'ambiente, finiscono presto col fondersi insieme ed allora l'aspetto della intiera cultura assume un carattere oltremodo curioso. Sembra cioè che alla superficie del gelosio sia stato colato un alto strato di paraffina opaca e che poscia, con un piccolo sigillo circolare, siano state praticate altrettante impronte profonde, quante corrispondono al numero delle primitive colonie trasparenti, circolari, sviluppate nella stufa.

Nei giorni successivi questo margine esterno della cultura segue tuttavia a svilupparsi; qualora la temperatura dell'ambiente si conservi sempre favorevole fra 20°-22° e se le colonie sono distanti le une dalle altre si osserva la manifestazione di un altro carattere biologico interessante. Il cercine madreperlaceo, dopo aver formato una specie di cratere all'intorno della piccola colonia sviluppata nella stufa, seguita a crescere dirigendosi verso le parti declivi del mezzo nutritivo ove cade lentamente a guisa di un piccolo ruscello di trementina di Venezia.

Se lungo il suo percorso, questo ruscello ne incontra degli altri, confluiscono insieme e finiscono col costituire una specie di rete a maglie irregolari, che si dirigono verso il basso lasciandosi addietro le impronte profonde delle piccole colonie sviluppate primitivamente alla stufa.

Ma giunte verso il decimo giorno le culture cominciano di nuovo a cambiare completamente di aspetto.

Tutti i *cercini*, i piccoli ruscelli colanti verso il basso, insomma tutta quella parte della cultura che si era sviluppata alla temperatura dell'ambiente, assumendo quell'aspetto opaco-madreperlaceo già descritto e sollevandosi molto al di sopra del livello delle primitive colonie sviluppate a 37°, comincia a poco a poco ad assottigliarsi, ad appiattirsi, quasi a *liquefarsi*, a divenir trasparente, infine a sparire quasi del tutto, lasciando solamente al suo posto una pellicola finissima e trasparente che ne marca i passati confini e ne conserva l'impronta.

Mentre si verifica questa strana metamorfosi nella parte della cultura sviluppata alla temperatura ambiente, le piccole colonie circolari primitive, cresciute a 37°, divengono alquanto più opache, ma rimangono invariate nella forma. E siccome tanto i lussureggianti cerchi esterni, quanto i piccoli rivi da essi derivati si

sono trasformati in una sottilissima pellicola trasparente, così l'aspetto finale della cultura è paragonabile ad un piccolo « arcipelago » in cui le *isole* emergenti alla superficie sarebbero rappresentate precisamente dalle stesse colonie sviluppate durante le prime 24 ore nella stufa a 37°, e la *superficie dell'acqua* dal sottile strato residuale della parte cresciuta alla temperatura dell'ambiente. Come è facile rilevare, si ha in questo caso una figura completamente rovesciata in confronto di quella che abbiamo descritto ai primi giorni di sviluppo.

Giunta a questo stadio la cultura rimane per sempre stazionaria, non verificandosi successivamente se non lievi modificazioni, dovute ad incostanti e svariati fenomeni d'involuzione.

La successiva manifestazione di tutti questi caratteri morfologici, che per la loro originalità costituiscono un esempio sin' ora unico in microbiologia, dipende esclusivamente dalla differente maniera di svilupparsi della colonia icteroide alla superficie del gelosio, a seconda che questo sviluppo si ottiene a temperatura bassa o a temperatura elevata.

Infatti se, dopo aver seminato il tubo di gelosio, lo si tiene alla temperatura dell'ambiente invece che nella stufa, si verifica un fenomeno opposto a quello ora descritto. Le colonie che mano a mano vanno comparendo alla superficie del gelosio, non sono uguali a quelle che si sviluppano nella stufa, ma appaiono come tante gocce di latte, a superficie lucente ed assai rilevate. Se la cultura è mantenuta sempre alla stessa temperatura, queste goccie finiscono col *colare* nelle parti declivi e col fondersi insieme senza presentare niente di caratteristico. Viceversa, se appena manifestatasi la piccola goccia di aspetto latteo, la cultura si porta nella stufa, apparisce immediatamente all'intorno di essa un nuovo *cercine* che, a differenza di quello che abbiamo descritto svolgersi a temperatura bassa, è piano, trasparente e iridescente, così che la colonia invece di presentare, come nel primo caso, la figura di un cratere o di un *sigillo di ceralacca*, presenta quella di un bottone con nucleo centrale più prominente della zona periferica.

È superfluo ripetere che per la verificazione di questi particolari morfologici, deve sempre impiegarsi il gelosio solidificato nei tubi obliquamente e seminare il materiale in piccola quantità, in modo da ottenere lo sviluppo di colonie il più possibilmente distanti fra

loro. La seminagione di un materiale abbondante, determinando infatti lo sviluppo di molte colonie rapidamente confluenti, impedisce la successiva comparsa del *cercine* caratteristico. Malgrado ciò, talvolta se ne osserva la comparsa anche attorno alle culture confluenti, presentando l'aspetto di un sottile nastro brillante ed opaco che ne segue e ne delimita esternamente i confini, alla superficie del mezzo nutritivo.

Come si comprende facilmente, questi caratteri morfologici presentati dal *bacillo icteroide* sono talmente originali, che possono venire utilizzati in pratica come *mezzo rapido e sicuro per la sua diagnosi bacteriologica.*

A tale scopo deve raccomandarsi anzitutto la massima diluzione del materiale di seminagione, sia esso puro o sia contaminato per la presenza di germi di differente natura.

Dopo eseguita la diluzione in un tubo di brodo sterile, si praticherà la seminagione del materiale, passando successivamente la medesima ansa di platino, alla superficie di parecchi tubi di gelosio, come si pratica correntemente per la diagnosi bacteriologica della difteria (1).

La diagnosi bacteriologica della febbre gialla può effettuarsi quindi in 24-26 ore al più tardi, e presenta su quella della difteria questo immenso vantaggio: una volta constatata la comparsa del cercine caratteristico, rimane quasi superfluo l' esame microscopico delle colonie.

La diagnosi bacteriologica, della febbre gialla, può quindi effettuarsi per ora anche senza l'impiego del microscopio.

---

(1) Nel corso delle mie ricerche ulteriori mi sono accorto che allorquando le culture han subito lunghi passaggi attraverso molti animali, parte delle colonie perde la proprietà di formare regolarmente su gelosio il *cercine* caratteristico. In tal caso solamente un piccolo numero di esse si presenta tuttavia nel modo descritto.

Affine di mantenere alle colonie il primitivo carattere che si osserva sempre allorchè esse si isolano dall'ammalato o dal cadavere, io ho l'abitudine di isolare e di impiegare sempre nei passaggi successivi, quelle colonie che si manifestano con il loro aspetto tipico completo.

Ciò conferma sempre più la straordinaria tendenza al pleomorfismo manifestata dal bac. icteroide in tutti i mezzi nutritivi artificiali.

Inoltre questo pleomorfismo indica che non si può ancora considerare come definitivamente compiuto lo studio morfologico del microbio della febbre gialla.

L'unica e non piccola difficoltà ch'essa presenta dal lato pratico, si è quella di poter ottenere, ogni volta dall'ammalato o dal cadavere, un materiale che contenga il microbio specifico.

4° Culture sul siero solidificato.

Questo mezzo nutritivo è poco propizio allo sviluppo del *bac. icteroide.*

La seminagione effettuata con un' ansa carica di una cultura in brodo, dà luogo alla produzione di uno straterello lucente, trasparentissimo e appena visibile. L'accrescimento è rapido, ma si arresta dopo 24 ore e perciò dà una cultura assai scarsa.

Qualora la seminagione si effettui con materiale scarso, le colonie che si sviluppano isolatamente, appaiono come altrettante goccioline di rugiada, semi-trasparenti e appena percettibili.

Le preparazioni colorate dei microbi sviluppati su siero conservano la cattiva reputazione di questo mezzo nutritivo. Infatti si osservano delle forme più piccole dell'ordinario, rotondeggianti e simili a micrococchi isolati o riuniti in paia.

5° Culture su patate.

Nemmeno la patata si presta bene alle culture del *bac. icteroide.* Questo si sviluppa sulla superficie di taglio, sotto forma di una sottile pellicola trasparente, *glacée*, affatto invisibile, la quale rimane ben tosto stazionaria e inalterata per molti mesi, senza imbrunire mai, come fa la ben nota cultura *classica* del bacillo tifico, che può considerarsene come presso a poco analoga.

Culture in mezzi nutritivi liquidi.

6° Culture in brodo di carne.

Il brodo di Löpfler semplice, può annoverarsi fra i mezzi nutritivi migliori per il microbio della febbre gialla.

Allorquando il microbio è isolato di recente dal cadavere e non pare ancora abituato a vivere su mezzi nutritivi artificiali, le prime seminagioni in brodo semplice risultano talvolta oltremodo scarse

o non riescono affatto. Lo stesso fenomeno si verifica allorquando si pratica la seminagione in brodo, ricavando il materiale da una vecchia cultura su gelosio.

In entrambi i casi le culture sono sempre scarse ed i microbi che vi si sviluppano, mostrano anche dopo le prime 24 ore, delle forme di involuzione, rappresentate da rigonfiamenti terminali a guisa di clave.

Si ripete perciò una circostanza identica a quella che ha avuto occasione di verificare chiunque abbia fatto ricerche col vibrione colerico. La cultura in brodo è sempre meno propizia della cultura su gelosio, soprattutto se il microbio, per una causa qualsiasi, ha perduto un po' del suo vigore vegetativo.

Allorquando il *bac. icteroide* si è abituato definitivamente a vivere sui mezzi nutritivi artificiali, la cultura in brodo si ottiene regolarmente e si effettua in forma di un intorbidamento sempre abbondante.

Non si producono mai nè pellicole, nè depositi fioccosi.

Non si ottiene buono sviluppo al di sotto di 14°-16° C.

I microbi si moltiplicano da principio in forma regolare ed alquanto più lunghi di quelli che si osservano su gelosio, ma dopo 5 o 6 giorni, cominciano a presentare numerose forme di involuzione. In tal caso le singole cellule si allungano, si rigonfiano ai poli, presentano delle nodosità, delle frammentazioni, delle degenerazioni vacuolari, ecc., sinchè circa al 10° giorno non si ritrovano più forme normali, e l'intiera cultura è trasformata in un insieme di figure bizzarre, affatto irreconoscibili.

7° Culture nel latte.

Lo sviluppo del *bac. icteroide* si ottiene facilmente nel latte, senza che si produca, nemmeno dopo molte settimane, la coagulazione della caseina. Questo fatto però, come vedremo più innanzi, non significa che il microbio della febbre gialla sia incapace di attaccare lo zucchero di latte e di produrre dell'acido lattico.

Culture in mezzi nutritivi speciali.

8° Culture in brodo di carne con lattosio al 2 % e Ca CO_3.

Questo è il miglior mezzo nutritivo liquido per il *bac. icteroide*, il quale vi si sviluppa rapidamente ed in abbondanza, senza tuttavia determinarvi nè pellicole, nè depositi fioccosi, nè alcuna apparente fermentazione dello zucchero.

9° Culture in brodo di carne con glucosio al 2 %.

In questo mezzo si ottiene una cultura abbastanza sollecita, ma si verifica quasi all'istante un' attiva fermentazione del glucosio con abbondante produzione di gas.

10° Culture in brodo di carne con saccarosio al 2 %.

Vi si ottiene un' abbondante cultura, senza visibile fermentazione dello zucchero.

11° Culture in brodo di carne con saccarosio al 2 % e Ca CO_3.

L' aggiunta di carbonato calcico svela una lieve fermentazione dello zucchero, la quale si manifesta con la comparsa di piccole e scarse bollicine di gas, che nelle prime ore di cultura compaiono alla superficie del liquido.

12° Culture su gelosio Wurtz.

(Gelosio contenente del lattosio e della tintura azzurra di laccamuffa).

In questo mezzo il *bac. icteroide* si sviluppa come su gelosio ordinario, ma a cominciare dal 2° o 3° giorno il colore azzurro del substrato comincia a poco a poco a virare verso il rosso, sicchè al 4° o 5° giorno la primitiva massa azzurra del gelosio è divenuta rosso-ciliegia. Ciò dimostra evidentemente che il *bac. icteroide*, il quale non è capace di manifestare proprietà fermentativa nei brodi

lattosati, attacca tuttavia lievemente lo zucchero di latte in un mezzo nutritivo, ove questa fermentazione può venir svelata in un modo squisitamente sensibile, anche in minime tracce.

Per conseguenza deve concludersi che il *bac. icteroide* fermenta in genere tutti gli zuccheri.

13° Culture su gelatina di patate.

(Acidità naturale). — Nessuno sviluppo.

14° Culture su gelatina di patate e I K al 1 %.

(Acidità naturale). — Nessuno sviluppo.

15° Culture su gelosio Elsner.

(Acidità naturale con brodo di patate, solfato di chinina al 1 % e acetato di Bario al 0.25 %).

Sviluppo lentissimo e limitato, a cominciare dalle 24 ore.

16° Culture in brodi Parietti.

Il *bac. icteroide* può svilupparsi in brodo di carne, tollerando sino a 9 gocce (per 10 cmc. di brodo) della miscela acida Parietti (acqua 100, ac. fenico 5, ac. cloridrico 4).

17° Culture in liquido di Pasteur.

(Acqua 100, zucchero candito 10, tartrato di ammonio 0,50, fosfato potassico 0,10).

Sviluppo assai scarso. I microbi vi conservano però i caratteri morfologici.

18° Culture in infuso di fieno.

Sviluppo quasi impercettibile. I microbi vi si moltiplicano stentatamente, presentando forme atipiche.

V.

Patologia comparata della infezione amarilla.

Il microbio specifico della febbre gialla è patogeno per la maggior parte degli animali domestici. Vi sono pochi microbi il cui dominio patologico sia così esteso e svariato. Infatti, ad eccezione dei volatili che sono completamente refrattarii, tutti i mammiferi, sui quali ho sperimentato, si sono dimostrati più o meno sensibili all'azione patogena del *bac. icteroide*.

Come materiale di inoculazione in tutte le mie esperienze, ho iniettato le culture di 24 ore in brodo contenente lattosio al 2 % e $CaCO_3$. Ho preferito il brodo *lattosato* al brodo semplice, perchè nel primo lo sviluppo del *bac. icteroide* è molto più rapido ed abbondante. L'aggiunta di un sale inattivo come il carbonato calcico mira ad un duplice scopo: 1° serve a neutralizzare le piccole quantità di acido lattico che il *bac. icteroide* fabbrica indubbiamente a spese del lattosio e che potrebbero influire sul suo ulteriore sviluppo; 2° serve a svelare immediatamente la presenza di eventuali e comuni contaminazioni microbiche, soprattutto dovute al *colibacillo*, *allo stafilococco* ed allo *streptococco*. Infatti nei brodi lactosati, i primi manifestano immediatamente la loro presenza, per mezzo di una attiva fermentazione, visibile anche dopo poche ore, per le ben note bollicine di acido carbonico che compaiono alla superficie e son dovute all'azione dell'acido lattico neoformato sul carbonato calcico.

Riguardo allo *streptococco*, poi, io ho utilizzato una circostanza interessante. È noto che tanto lo *streptococco* come il *bac. icteroide*, coltivati separatamente nel brodo con lattosio e $CaCO_3$ non determinano alcuna fermentazione visibile, quantunque entrambi siano poi capaci di attaccare lentamente il lattosio con produzione di piccole quantità di acido lattico. Allorquando invece trovansi uniti, la fermentazione si manifesta sempre con produzione di CO_2 anche nei brodi lattosati ed in maniera così regolare che questo può adottarsi come criterio indicatore di un valore assolutamente sicuro.

Le svariate ricerche intraprese all'oggetto di stabilire se l'esaltamento delle proprietà fermentative, dovuto alla simbiosi di questi

due microbi, provenga dal *bac. icteroide* o dallo *streptococco*, ovvero da entrambi, non mi han portato a resultati definitivi.

La patologia comparata del *bacillo icteroide* trovasi compendiata nella esposizione sommaria delle seguenti esperienze:

A) L'infezione amarilla nei topolini (Mus musculus albinus).

Questi piccoli animali sono estremamente sensibili anche all'azione di piccolissime dosi del virus icteroide. Qualche goccia iniettata sotto la cute li uccide regolarmente, dopo una malattia di 3-5 giorni.

I sintomi presentati durante questo periodo non hanno nulla di caratteristico: 24 ore dopo l'iniezione, l'animale comincia a perdere l'abituale vivacità, diviene triste e si raccoglie in un angolo della gabbia; in seguito gli si manifesta una secrezione catarrale delle palpebre, chiude gli occhi, si raffredda e muore.

Il reperto anatomo-patologico è il seguente: il *fegato* presenta delle macchie biancastre affatto simili alle ben note *taches anémiques* di Hanot. In corrispondenza di queste macchie, le cellule epatiche esaminate a fresco si presentano in preda ad una intensa degenerazione granulare; la *milza* è enormemente tumefatta ed emorragica e raggiunge talora 3-4 volte il volume normale; i *reni* si presentano pure molto congesti e con l'aspetto della glomerulo-nefrite.

Le culture dimostrano la presenza di innumerevoli quantità di microbi tanto nel sangue quanto negli organi. Nel sangue e nella milza possono osservarsi in quantità, anche col semplice esame microscopico diretto, previa una colorazione qualsiasi.

Si tratta quindi di una vera infezione setticemica che si manifesta dopo 5 giorni di malattia.

Le culture delle cavità sierose dimostrano un numero di microbi talora assai scarso, e in ogni caso molto inferiore a quello che si rintraccia nel sangue e nel parenchima degli organi.

B) L'infezione amarilla nelle cavie.

La cavia è un animale molto sensibile al *bacillo icteroide*.

La infezione può indifferentemente ottenersi per via sottocutanea, peritoneale, intravenosa, o intratracheale.

La durata della malattia, come il reperto anatomico e bacteriologico, variano alquanto a seconda della maniera come si determina l'infezione.

1°) *Infezione sottocutanea.* La dose minima mortale non può stabilirsi. Nel corso delle mie esperienze, io impiego ordinariamente la dose di 0.5 cmc. di una brodo-cultura di 24 ore, ma i resultati non variano molto quand'anche s'impieghino 5 cmc., o 0,1 cmc.

La febbre gialla sperimentale nelle cavie è una malattia ciclica, che non può essere influenzata, di regola, dalla dose del virus inoculato.

Questa malattia dura in media dai 5 agli 8 giorni, ma il maggior numero dei decessi si verifica per lo più al 7° giorno di malattia.

Eccezionalmente le cavie possono tuttavia morire dopo le prime 48 ore o dopo 15-20 e 30 giorni. Però, come ho già detto, ciò non dipende dalla quantità della cultura inoculata, ma da speciali condizioni di resistenza dell'animale, poichè, in molte serie di ricerche istituite allo scopo di risolvere in modo definitivo questo punto controverso, ho visto morire regolarmente al 6° o 7° giorno, o anche prima, le cavie inoculate con 0,1, 0,2, 1,0 cmc. ecc. e sopravvivere sino al 14° od al 16° giorno le cavie inoculate con 0,3, 2,0 cmc.

I fenomeni rilevabili durante il periodo della malattia sono due: la febbre ed il dimagramento. Infatti, 24 ore subito dopo l'iniezione del virus, la temperatura rettale della cavia, che normalmente è di 38°-39° C., sale a 39°6-40°8 e si verifica una diminuzione nel peso di 20-30 e più grammi. L'animale manifesta tuttavia la consueta vivacità. Nei giorni successivi, la temperatura sale sino ai 41°-41°.5' ed il peso del corpo segue a diminuire irregolarmente, ma quasi senza interruzione sino alla morte, che avviene, di regola, come ho già detto, fra la 5ª e l'8ª giornata, preceduta da qualche scarica diarroica.

Il reperto anatomico è il seguente: il punto d'innesto presenta talvolta un edema emorragico o un'estesa infiltrazione con aspetto lievemente purulento; le *ghiandole linfatiche* ascellari sono straordinariamente ingrossate e congeste; all'apertura della *cavità toracica*, i *polmoni* si presentano in condizioni normali, talvolta sono cosparsi di piccole macchie ecchimotiche e, nei casi a decorso molto lungo,

trovansi entrambe le cavità pleuriche ed il pericardio ripieni di un trasudato citrino od emorragico. Il muscolo cardiaco è normale; al disotto dello sterno la *ghiandola timo*, soprattutto nei casi di più lunga durata, apparisce molto ipertrofica, di aspetto pallido, quasi bianco-giallognolo, purulento.

All'apertura della cavità addominale, il *peritoneo* si presenta quasi sempre alquanto congesto, ma solamente nei casi un pò cronici è dato riscontrare una piccola quantità di essudato, d'ordinario assai denso e talora così ricco di elementi linfoidi da aver l'aspetto di un liquido lattescente; il *fegato* è sempre congesto, ma di aspetto normale. Solamente nei casi cronici, allorquando cioè l' animale viene a morte dopo molti giorni, il fegato si presenta evidentemente degenerato, grigio-pallido e con l'aspetto di noce moscata. In una cavia morta dopo due mesi e mezzo, al seguito di una seconda iniezione di *virus*, da 25 gr. di sostanza epatica vennero estratti 13 gr. di sostanza grassa. Malgrado ciò la degenerazione grassa delle cellule epatiche non arriva mai ad assumere nella cavia quell'aspetto che abbiamo descritto nell'uomo e che ritroveremo più innanzi in altri animali.

Nelle cavie la cellula epatica è molto resistente all'azione del veleno icteroide, il quale produce per lo più un intorbidamento granuloso del protoplasma e fenomeni di necrosi cellulare, che ben di rado son seguiti da processi spiccati di degenerazione adiposa.

L'ipertrofia della *milza* costituisce il reperto costante e più caratteristico della infezione amarilla nelle cavie. Essa presentasi sempre molto pronunciata e raggiunge talora 4-5 volte il volume normale. In tal caso l'organo è rosso-brunastro, poco resistente, ricchissimo di polpa e facilmente friabile. Il grado di questa ipertrofia dipende soprattutto dalla durata della malattia. Nei casi che eccezionalmente decorrono in 3 o 4 giorni, il tumore splenico è poco pronunciato; in quelli che oltrepassano l' estremo termine ordinario di 8 giorni, si presenta sempre più grosso, sino a raggiungere talvolta dimensioni straordinarie.

Se la malattia ha una lunga durata (casi cronici) la milza appare più pallida del solito e ciò dimostra il carattere produttivo del processo infiammatorio che finisce col dar luogo alle ben note alterazioni durature, rappresentate dalla iperplasia della polpa, delle trabecole, pareti vasali, ecc.

Dopo la milza, l'organo che più frequentemente richiama l'attenzione nelle cavie è il *rene*. Il tessuto renale della cavia non reagisce al veleno amarillo con quella sensibilità che reagisce il tessuto renale dell'uomo o di qualche altro animale che studieremo in appresso. Tuttavia tanto nei casi acuti che cronici, quest'organo si trova nelle cavie sempre alquanto alterato. Nei casi acuti si tratta specialmente di processi congestivi, nei casi cronici è evidente una alterazione glomerulare che è caratterizzabile anche ad occhio nudo.

Riguardo all'*urina* la ricerca dell'albumina non dà nelle cavie risultati attendibili. Poche volte ho potuto dimostrarne la presenza, impiegando la prova dell'anello, in casi che avevano durato 16-20 giorni. Una sola volta potei svelarla in minime tracce nell'urina di una cavia morta dopo 6 giorni di malattia, per cui tali reperti non possono avere importanza alcuna.

In quanto all'*apparato digestivo* della cavia, contrariamente a quanto io potei stabilire per il veleno tifico e all'opposto di quanto si verifica nell'uomo e nel cane, pare molto resistente all'azione specifica del veleno amarillo. Infatti, nella massima parte delle autopsie praticate negli animali morti per infezione sottocutanea (e che ammontano già a qualche migliaio) io ho riscontrato il canale intestinale quasi affatto normale, se si eccettua la esistenza di una lieve distensione o di uno stato congestivo generale, più o meno marcato e che è comune a tutte le infezioni sperimentali. Solo in alcuni casi decorsi eccezionalmente in maniera acutissima, per l'iniezione di un *virus* transitoriamente esaltato (morte avvenuta dopo 36-48 ore) potei osservare il tubo digestivo con tutte le note di una gastro-enterite acuta, con larghe porzioni dell'intestino tenue ripiene di sangne.

Ma ciò che rappresenta il fatto più saliente della infezione amarilla sperimentale nelle cavie, non è tanto il quadro delle alterazioni morbose, quanto il reperto bacteriologico.

Chiunque consideri, infatti, *a priori* il lungo decorso ciclico di questa infezione nelle cavie, si trova più propenso a considerare il processo morboso come un'intossicazione, anziché come un'infezione comune. Malgrado ciò le culture eseguite dal sangue e dai visceri delle cavie che muoiono dopo il consueto periodo di 6-8 giorni, dimostrano, una straordinaria abbondanza di microbi diffusi in tutto l'organismo soprattutto nella milza. Le cavie muoiono quindi d'infezione a forma setticemica.

A misura che la morte si allontana dal termine ordinario suindicato, i microbi incontrati all'autopsia sono sempre meno abbondanti. Cominciano a diminuire e quindi a sparire, anzitutto dal sangue circolante, ove si trovano sempre meno abbondanti anche nelle forme acute, quindi dai reni e successivamente dal fegato.

La milza è l'organo ove si riscontrano sempre dei microbi, anche dopo lunga malattia. Solamente in alcuni casi di eccezionale durata (40-50 giorni) l'animale può morire d'intossicazione e di cachessia, presentandosi il cadavere sterile.

Dopo stabilito il fatto abbastanza curioso di una setticemia che uccide gli animali dopo una malattia febbrile di 7 giorni, rimaneva a studiarsi il comportamento dei microbi inoculati nell'organismo durante questo periodo ciclico.

A tale scopo ha inoculato, all'istesso tempo, varie serie di cavie, che sacrificava di 12 in 12 ore, praticando culture comparative dal sangue e dai visceri sino a che, terminato il periodo ciclico, non cominciavano a soccombere spontaneamente.

In tal guisa potei verificare il seguente ordine di fatti: dopo 12 ore i microbi inoculati sotto la cute compaiono già costantemente nella milza, solo coltivando grandi quantità di sangue in mezzi liquidi possono ottenersi delle culture positive.

Dopo 24 ore si ottiene qualche cultura positiva anche dal fegato.

Dal 2° al 5° giorno inclusivo, salvo eccezioni, le culture o rimangono affatto sterili o dimostrano la presenza di scarsi microbi solamente nella milza. Al 6° giorno si verifica una improvvisa invasione generale dei microbi nel sangue e negli organi, rimanendo sempre la milza la loro sede preferita; così che al 7° giorno, allorquando cioè si verifica spontaneamente la morte, la generale ed abbondante moltiplicazione dei microbi assume il tipo di una vera e propria setticemia.

Questa maniera di comportarsi dei microbi icteroidi nell'organismo delle cavie durante la malattia che abbiamo descritta, merita di richiamare tutta la nostra attenzione, non solamente perchè, come vedremo più innanzi, si ripete il medesimo fatto anche nei conigli e nelle scimmie, ma perchè questo tipo d'infezione sperimentale presenta molte analogie con quello spontaneo che si verifica nell'uomo.

Un ultimo fatto su cui non è superfluo richiamare l'attenzione nel reperto microbiologico della infezione sottocutanea nelle cavie, è la completa assenza o la somma scarsità dei microbi nelle cavità sierose.

Infatti anche nei casi a decorso acutissimo, le cavità pleurica e peritoneale, resultano per lo più sterili o dànno luogo a rare colonie. L'esame microscopico dell'umore peritoneale mostra talvolta la presenza di grandi fagociti affatto ripieni di microbi, senza che questi possano ritrovarsi allo stato libero.

Ciò contrasta singolarmente col resultato della maggior parte delle infezioni sperimentali, soprattutto di quelle dovute al *colibacillo* od al *bacillo tifico*, i quali, come è noto, qualunque sia la via di penetrazione nell'organismo, trovano sempre, massime nella cavità peritoneale, un mezzo elettivamente favorevole alla loro localizzazione ed alla loro moltiplicazione.

2°) *Infezione peritoneale.* Questa maniera d'infezione nelle cavie, presenta solo interesse, inquanto stabilisce un fatto che noi utilizzeremo in appresso e che sta in rapporto con quanto abbiamo terminato di dire ora, relativamente alle localizzazioni sierose del bacillo icteroide, e con ciò che segnalammo a proposito della infezione nei topolini.

Anzitutto, per ciò che riguarda la durata della malattia, può ritenersi che la via peritoneale ne abbrevia alquanto il decorso.

Per lo più le cavie muoiono in 4 giorni, presentando di regola dimagramento notevole e un abbondante essudato siero-fibrinoso nel peritoneo. In tutto il rimanente il reperto anatomo-patologico è identico a quello che si riscontra nelle cavie uccise per infezione sottocutanea.

Eccezionalmente e indipendentemente dalla dose del *virus*, che una volta fu di 10 cmc.!, la morte può avvenire alla fine del solito periodo classico, cioè dopo 6-7 giorni. In tal caso l' essudato peritoneale è di solito emorragico e le lesioni dei visceri sono molto più accentuate: il *timo* è straordinariamente ipertrofico, la *milza* è grandissima, i *reni* sono infiammati e l'*urina* può presentare albumina, corpuscoli grassi e persino spermatozoidi.

L'infezione è sempre generale e a tipo setticemico come in tutti gli altri casi, ma l'interessante si è che l'essudato peritoneale, qualunque sia la sua natura, presenta una quantità così scarsa di

microbi, che non si trova affatto in relazione col loro numero, così abbondante in tutto il resto dell'organismo.

Oltre a ciò l'esame microscopico dell'essudato peritoneale ben raramente dimostra la presenza di bacilli liberi: tutti i microbi trovansi regolarmente nell'interno dei leucociti polinucleati.

Ciò depone indubbiamente pel senso che il *bacillo icteroide, anche nei casi in cui vinta la resistenza naturale dell'organismo, produce un'infezione generalizzata, trova sempre difficoltà a vivere ed a moltiplicarsi nelle grandi cavità sierose.*

3°) *Infezione intravenosa.* È un genere d'infezione che non presenta vantaggi sperimentali superiori agli altri.

L'iniezione del *virus* nelle vene presenta il solo scopo di abbreviare talora il periodo della malattia, come la infezione peritoneale. In quanto alle lesioni anatomiche ed al comportamento dei microbi nell'organismo, il resultato è uguale a quello che si ottiene mercè le iniezioni sottocutanee.

4°) *Infezione per le vie respiratorie.* Questa maniera di contagio presenta anche dal punto di vista pratico un certo interesse inquantochè, come è noto, rimane ancora da stabilirsi quale sia in natura la via di penetrazione del *virus* amarilligeno nell'organismo umano.

Determinavo la infezione iniettando direttamente in trachea, previa tracheotomia, una goccia di brodo-cultura di 24 ore.

La morte dell'animale avviene di regola fra le 16 e le 18 ore dopo. Nei casi a decorso più rapido, si riscontra all'autopsia una pneumonite lobulare bilaterale, con congestione intensa della maggior parte del polmone, ed essudato sieroso o lievemente emorragico nella pleura; il peritoneo contiene di solito un po' di trasudato citrino, il fegato e la milza sono congesti, gl' intestini sono diarroici e presentano un' enterite desquamativa.

Il reperto bacteriologico *per lo più è negativo.* Raramente trovansi scarsi microbi nell'essudato pleurico e nella milza.

Allorquando le cavie muoiono dopo due giorni, il reperto anatomico è *affatto negativo*: non si han tracce di processi infiammatorii nei polmoni, nè si trova la benchè minima alterazione nei visceri: persino la milza è di aspetto normale. Il reperto bacteriologico dimostra solo la presenza di piccole quantità di microbi nei polmoni *apparentemente sani* e, come sempre, nella milza.

Quindi nei casi di infezione ottenuta nelle cavie per la via re-

spiratoria, il *processo morboso, anzichè il tipo consueto di un'infezione generale, assume quello di una vera e propria intossicazione.*

Non possono sfuggire ad alcuno le strette analogie di questo resultato con quelli che si ottengono spesso nella febbre gialla umana, allorquando si ritrova il cadavere affatto sterile o semplicemente contaminato da pochi microbi d'infezioni secondarie.

Qualunque sia la via di penetrazione del *virus* e la durata della malattia nelle cavie, questa decorre sempre senza infezioni secondarie. Le culture che si ottengono all'autopsia resultano completamente pure.

Riguardo alla virulenza dei microbi, dirò in maniera generale che il *bacillo icteroide* conserva abbastanza bene ed a lungo la propria virulenza nelle culture artificiali.

Dalle cavie che muoiono entro il periodo ciclico abituale, si ottiene il *virus* dotato di un' attività sempre costante.

Nelle culture ottenute nei casi in cui eccezionalmente la morte si verificò in 2 o 3 giorni, non si osserva alcun aumento della virulenza ordinaria. Le loro iniezioni in altre cavie riproducono invariabilmente il periodo ciclico consueto della malattia.

Ho osservato talvolta verificarsi la morte in 36-48 ore al seguito di iniezioni di culture ottenute da gatti e da scimmie. Ma questo fatto non è costante, ed oltre a ciò tale supposto aumento di virulenza è affatto transitorio, giacchè al 2° passaggio questa ritorna subito allo stato normale.

Alcuni tentativi rivolti allo scopo di ottenere nelle cavie una malattia a decorso acutissimo e costante, sono rimasti infruttuosi. L'infezione amarilla nelle cavie manifesta sempre una tendenza straordinariamente sviluppata a mantenere il suo decorso ciclico abituale.

In conclusione: la malattia determinata nelle cavie dal *bacillo icteroide* presenta i seguenti caratteri principali e costanti: adeniti ascellari e inguinali e lesioni epatiche degenerative nei casi cronici; meno frequentemente si incontrano: enterite, nefrite e albuminuria; assai di rado possono osservarsi, infine, versamenti emorragici delle sierose.

Il reperto bacteriologico è quello di una *infezione* nei casi in cui la penetrazione del *virus* si effettuò per via sottocutanea, intravenosa o peritoneale, e quello di una *intossicazione* nei casi di contagio per le vie respiratorie.

C) L'infezione amarilla nei conigli.

Il coniglio può considerarsi come l'animale di scelta per l'infezione amarilla sperimentale.

Esso è dotato di un sensibilità più spiccata di qualunque altro animale di laboratorio ed ha sulle stesse cavie i seguenti vantaggi; muore sempre ad un periodo fisso, non presenta mai la malattia cronica, qualunque sia la dose del *virus* impiegata, e può uccidersi regolarmente in 48 ore per iniezione intravenosa.

È utile far notare a questo punto che, per le esperienze nei conigli, non è indifferente impiegare culture ottenute dalle cavie e reciprocamente.

In generale ho notato che il *virus* passato attraverso le cavie, mentre si conserva molto attivo per queste ultime, si attenua alquanto per il coniglio, e reciprocamente: il *virus* di passaggio nei conigli si attenua per le cavie. Debbo aggiungere però che questo carattere del *virus* amarilligeno non assume sempre il valore di una legge costante.

Una duplice serie di ricerche istituite all'oggetto di stabilire l'importanza di questo fatto, mi ha dato i resultati che riassumo nella seguente tavola.

Il *virus* dei conigli proveniva da 67 passaggi successivi e non interrotti, ottenuti sempre per iniezione intravenosa.

Il *virus* delle cavie proveniva da un numero indeterminato di passaggi successivi, ottenuti sempre da cavia a cavia, sin dal principio dei miei lavori.

Le iniezioni furono eseguite per via sottocutanea.

VIRUS PASSATO ATTRAVERSO I CONIGLI

	Dose della cultura inoculata	Morto dopo		Dose della cultura inoculata	Morta dopo
Coniglio 1.° . .	0.1 cm. c.	48 ore	Cavia 1.ª . . .	0.1 cm. c.	22 giorni
Coniglio 2.° . .	0.2 id.	7 giorni	Cavia 2.ª . . .	0.2 id.	17 id.
Coniglio 3.° . .	0.5 id.	5 id.	Cavia 3.ª . . .	0.5 id.	23 id.
Coniglio 4.° . .	1.0 id.	5 id.	Cavia 4.ª . . .	1.0 id.	10 id.
Coniglio 5.° . .	2.0 id.	5 id.	Cavia 5.ª . . .	2.0 id.	5 id.

VIRUS PASSATO ATTRAVERSO LE CAVIE

	Dose della cultura inoculata	Morto dopo		Dose della cultura inoculata	Morta dopo
Coniglio 1.° . .	0.1 cm. c.	3 giorni	Cavia 1.a . . .	0.1 cm. c.	3 giorni
Coniglio 2.° . .	0.2 id.	8 id.	Cavia 2.a . . .	0.2 id.	7 id.
Coniglio 3.° . .	0.5 id.	7 id.	Cavia 3.a . . .	0.5 id.	10 id.
Coniglio 4.° .	1.0 id.	8 id.	Cavia 4.a . . .	1.0 id.	5 id.
Coniglio 5.° . .	2.0 id.	8 id.	Cavia 5.a . . .	2.0 id.	6 id.

Malgrado le grandi oscillazioni presentate dai risultati di queste esperienze, ciò che è un' occorrenza molto comune alla infezione amarilla sperimentale, in complesso emerge tuttavia il fatto cui ho accennato or ora. *Le culture passate per i conigli risultano in questi animali molto più attive che non le culture passate attraverso le cavie e reciprocamente.* L'attenuazione del *virus* che proviene da passaggi attraverso animali di specie differenti si rende molto più manifesta nelle cavie che non nei conigli, perchè questi ultimi, come ho già detto, sono anche molto più sensibili delle prime alla infezione amarilla.

È probabile che dalle tavole suesposte non isfugga il rilievo di un particolare effettivamente curioso. In entrambi le serie dei conigli e nella ultima serie delle cavie le più piccole dosi di *virus* furono quelle che uccisero in più breve spazio di tempo.

È un fatto questo che non ho avuto occasione di verificare ripetutamente in altre serie di ricerche, ma di cui mi è impossibile dare spiegazione, tanto più che non si ripete in maniera costante.

L'infezione sperimentale nei conigli può determinarsi per le medesime vie che abbiamo studiate nelle cavie.

1°) *Infezione sottocutanea.* — La dose minima mortale non è stabilita, ma sperimentalmente può considerarsi come molto piccola. dal momento che si ottiene la morte degli animali nello stesso periodo di tempo oscillante fra i 4 ed i 5 giorni, tanto se si inietta 0. 1 cmc., come se si iniettano 2 cmc. Eccezionalmente la morte può verificarsi in uno spazio di tempo molto più breve.

I fenomeni obbiettivi presentati durante la malattia, non hanno nulla di interessante.

L'animale ha delle ipertermie e una costante diminuzione del peso del corpo, ma rimane del medesimo aspetto e ben portante, anche allorquando i microbi trovansi in quantità nel circolo sanguigno.

Il processo biologico della infezione nei conigli è in gran parte identico a quello che abbiamo segnalato nelle cavie, con la sola differenza che la invasione generale dei microbi nell'organismo si verifica precocemente e molto tempo avanti la morte.

Infatti, sacrificando ogni 12 ore i conigli inoculati contemporaneamente con una dose di 0. 5 cmc. di brodo-coltura, risulta il seguente: durante le prime 24 ore tutti gli organi si trovano sterili, ma a principiare dalla 36ª ora, le culture dal sangue e dal fegato sono positive e quelle dalla milza dimostrano il *b. icteroide* in quantità innumerevoli; al 3° giorno tutto l'organismo è già invaso, la milza è già ipertrofica e farcita di microbi. È facile ottenere abbondanti culture dallo stesso sangue circolante, anche 24 ore avanti la morte, ritirandone da una vena auricolare qualche goccia, per mezzo d'una pipetta affilata.

Il reperto anatomico presenta i seguenti caratteri: notevole ipertrofia dei gangli ascellari e inguinali; soprattutto in quelli corrispondenti al lato in cui venne praticata la inoculazione; nella cavità toracica appare straordinariamente ipertrofica e congesta la glandula *timo:* i polmoni sono integri. All'apertura della cavità addominale le *masse intestinali* appaiono abnormemente distese e diarroiche, e talvolta si trova raccolta nello stesso cavo addominale una certa quantità di liquido emorragico. La *milza* è sempre ipertrofica, per cui rappresenta nei conigli, come nelle cavie, il carattere costante e quasi specifico della infezione amarilla. Il grado di tumore splenico non è sempre identico, ma presenta presso a poco il medesimo aspetto della milza pneumococcica: è di un colorito rosso-bruno, tumefatta, consistente e a superficie di sezione asciutta. L'esame istologico delle sezioni indurite in alcool od in liquido di Flemming, dimostra una enorme infiltrazione emorragica di tutto il tessuto splenico, specialmente al di sotto della capsula; gli elementi proprî della milza trovansi dissociati o riuniti in piccoli gruppetti, in mezzo a grandi estensioni di sangue stravasato. I microbi vi si ritrovano

in abbondanza, ma sono riuniti, come nell'uomo, in piccoli ammassi compatti, situati fra mezzo alle raccolte sanguigne.

Il *fegato* è sempre molto congesto e di colore oscuro. Allo esame istologico (fissazione in liquido di FLEMMING e colorazione col metodo di MARTINOTTI) appare anzitutto una enorme congestione vasale di tutto l'organo, e tanto le vene centrali quanto la rete capillare circostante sono così dilatate e turgide di sangue che la travatura cellulare trovasi spesso straordinariamente compressa e ridotta.

In alcuni punti il protoplasma cellulare presentasi meno granuloso, quasi rarefatto o vacuolare e talvolta diminuito di volume, ma i suoi contorni si mantengono sempre molto netti. I nuclei appaiono per lo più integri; nel connettivo perilobulare esiste sempre in grado diverso una infiltrazione parvicellulare talora assai notevole. Nel coniglio si comincia ad osservare la steatosi delle cellule epatiche, ma essa è assai limitata. La maggior parte delle cellule risulta immune, ma in ogni campo del microscopio si osservano molti gruppetti di gocce di grasso di varie dimensioni, colorate in nero dall'acido osmico. Queste gocciolette adipose sono situate nel tessuto epatico senza una regola fissa, ora in forma di piccoli ammassi, ora in forma di catenelle o di fini granulazioni irregolarmente distribuite. Non si osservano mai gocce di grandi dimensioni, simili a quelle che ritroveremo nel fegato degli animali più elevati nella scala zoologica e che abbiamo descritte nel fegato umano.

I *reni* presentano nei conigli, con maggior frequenza che nelle cavie, alterazioni di natura infiammatoria. Sono molto frequenti le affezioni glomerulari e le emorragie puntiformi della sostanza corticale. L'esame istologico dimostra sempre un rigonfiamento torbido nella maggior parte degli epitelii, buona parte dei quali trovansi molto spesso completamente necrotici e ridotti in ammassi informi, granulosi e senza nucleo.

Il lume dei tubuli trovasi notevolmente ridotto e talora riempito di *detritus*, elementi epiteliali e cilindri ialini, talora assai estesi contenenti nel loro interno cellule epiteliali. In alcuni punti queste cellule epiteliali sono cadute dalla sezione ed allora il cilindro assume un aspetto fenestrato.

I glomeruli presentano talvolta delle anse vasali spogliate dell'epitelio, ma in generale non sembrano che eccessivamente riempiti

di sangue. Anche i vasi sanguigni del tessuto connettivo interlobulare sono in vari punti assai dilatati, presentano numerosissimi sfiancamenti lacunari lungo il loro asse, che raggiungono in dimensione molte volte il diametro delle sezioni dei tubuli, e sono visibili anche ad occhio nudo nei pezzi induriti in alcool, sotto forma di piccoli raggi brunastri che si dirigono perpendicolarmente alla parte corticale, seguendo il decorso dei canalicoli.

Non sono poi rare le estese emorragie interstiziali con distruzione di una gran parte di tessuto renale. In tal caso la zona emorragica appare come uno strato compatto uniforme di fibrina coagulata, in mezzo a cui si trovano accumuli di globuli sanguigni e intiere sezioni trasversali di tubuli renali dissociati in blocco dal rimanente del tessuto.

Riguardo alla *degenerazione grassa* essa è assai poco accentuata solamente nel centro di pochi tubuli, ove, in mezzo a detriti epiteliali degenerati, si osservano talora alcune finissime granulazioni nere.

In quanto all'*urina*, essa può trovarsi in vescica in quantità variabile, talvolta limpida; tal'altra straordinariamente ricca di sedimento. La presenza dell'albumina non è costante, ma in alcuni casi è facile porla in evidenza anche con mezzi molto grossolani, come il riscaldamento.

I risultati del reperto bacteriologico sono i seguenti: i microbi trovansi diffusi nel sangue e negli organi in quantità innumerevole ed allo stato di assoluta purezza: solamente nella cavità peritoneale sono sempre molto scarsi e per la maggior parte inglobati dai leucociti. Si tratta quindi di una vera e propria setticemia, molto più grave di quelle che abbiamo descritto nei topi e nelle cavie.

Siccome l'infezione amarilligena non assume mai nei conigli la forma cronica, così le alterazioni anatomiche sono limitate a quelle che abbiamo or ora descritte. Nessun coniglio, infatti, fra le varie centinaia da me sacrificati, ha sopravvissuto alla infezione oltre il termine suindicato, qualunque fosse stata la dose del *virus* inoculato.

2°) *Infezione intravenosa.* — Non diversifica della precedente se non nella durata della malattia e nella intensità delle lesioni anatomiche.

Conservando il *virus* in condizioni di massima attività per mezzo di continui passaggi successivi, si giunge ad ottenere, come *regola*

fissa, la morte dei conigli in 48 ore, mercè l'iniezione intravenosa (in una vena marginale dell'orecchio) di 0.1 cmc. d'una brodo-cultura di 24 ore.

La sola differenza che esiste fra il reperto anatomico della infezione per via sottocutanea e quello della infezione per via intravenosa, è rappresentata dal tumore di milza, che in quest'ultimo caso è sempre un po' meno pronunciato.

Malgrado ciò, possono considerarsi come frequenti i casi in cui trovasi un grande tumore splenico anche al reperto della infezione intravenosa. Oltre a ciò la distribuzione dei microbi nei tessuti non è uguale a quella, che abbiamo descritto più sopra nei conigli che muoiono per infezione sottocutanea. In tal caso, infatti, abbiamo visto che i *bac. icteroidi* si riuniscono in piccoli ammassi, per cui nelle sezioni appaiono quasi sempre sotto forma di mucchietti. Allorquando, invece, il coniglio muore in 48 ore per iniezione intravenosa, i microbi appaiono nelle sezioni distribuiti irregolarmente fra i tessuti, ove non formano quasi mai riunioni abbondanti.

Talora si osserva inoltre l'enterite emorragica; una sola volta osservai un caso tipico di emoglobinuria. La vescica urinaria era in tal caso completamente riempita di urina color rosso-bordeaux, l'esame microscopico non rivelò la presenza di globuli rossi. Si trattava quindi di pigmento sanguigno disciolto e passato attraverso al rene. Questo organo si presentava, infatti, in entrambi i lati, gravemente alterato. Circa la metà di esso appariva straordinariamente congesta, di un colorito quasi nerastro e di consistenza molle.

La constatazione di questi reperti, quantunque estremamente rari, costituisce un argomento di più in appoggio alla grande importanza da annettersi alla disposizione individuale, nella estrinsecazione dei fenomeni morbosi dovuti ad un medesimo virus.

3°) *Infezione per le vie respiratorie.* — Questo modo d'infezione è sempre sicuro riguardo all'esito, perchè il coniglio, come la cavia, soccombe invariabilmente; ma è più incostante di ogni altro riguardo alla durata della malattia. Infatti, la medesima dose di 2 o 3 gocce di brodo-cultura, inoculate direttamente nell' albero bronchiale, previa tracheotomia, può uccidere in 16 ore, come in 5 o 6 giorni.

Nel primo caso le lesioni anatomiche si limitano solo a piccolissimi focolai di infiltrazione polmonare ed a congestioni viscerali

diffuse. La milza presentasi però già alquanto tumefatta e gl'intestini sono distesi e diarroici.

Nei casi a decorso più lungo, i polmoni si presentano edematosi e con molteplici focolai di pneumonite lobulare; talvolta si osservano pure intieri lobi polmonari in preda a veri processi di epatizzazione rossa; le ghiandole linfatiche bronchiali sono ipertrofiche e il tumore di milza è enorme.

Riguardo al reperto bacteriologico, esso è sempre quello di una setticemia. L'essudato polmonare è ricco di microbi, al pari di tutti gli altri umori dell'organismo.

Le cavità sierose, nei casi che decorrono acutissimamente, si riscontrano per lo più sterili del tutto, ma nei casi che si protraggono per alcuni giorni, sono invase alla loro volta da una certa quantità di microbi. Il loro numero è però molto inferiore a quello che si riscontra nei visceri o nel sangue circolante.

Si ripete quindi anche in questo genere di infezione, che può considerarsi come uno dei più gravi, il medesimo fatto già riscontrato nella infezione amarilligena dei topi e delle cavie, vale a dire la resistenza delle cavità sierose alla localizzazione del *bac. icteroide.*

Riassumendo perciò i nostri risultati intorno alla infezione amarilligena sperimentale nei conigli, noi troviamo come fenomeni costanti: il decorso ciclico della malattia, le adeniti ascellari e inguinali, l'ipertrofia della ghiandola timo e il tumore splenico. Oltre a ciò il virus icteroide è capace di determinare nei conigli: la nefrite, l'enterite, l'albuminuria e l'emoglobinuria; talvolta può infine manifestare proprietà emorragipare.

D) L'infezione amarilla nei cani.

Il cane si presta meglio di qualunque altro animale di laboratorio per far risaltare le strette analogie anatomiche e sintomatologiche della febbre gialla sperimentale con la febbre gialla dell'uomo. Ma siccome non è un animale così sensibile come la cavia ed il coniglio, così l'iniezione del virus deve essere praticata per via intravenosa e a dose piuttosto elevata, che non è possibile prestabilire in ogni caso, giacchè è influenzata, volta per volta, dalla gran-

dezza, dalla età e dalla razza. Determinato però il processo infettivo, questo si manifesta e si sviluppa con una tale violenza di sintomi e con un tal complesso di lesioni da far ricordare il quadro clinico ed anatomico della febbre gialla nell'uomo.

È impossibile tracciare un quadro morboso generale, come abbiamo fatto per le cavie e per i conigli, in cui la malattia assume un tipo quasi costante.

Nei cani i risultati delle esperienze variano quasi caso per caso. Formano eccezione solamente quelli in cui la morte si verifica per setticemia acutissima in 12-24 ore. Vale meglio perciò riferire alcune esperienze fra le più tipiche.

Esperimento I. — Cane di Kg. 10.200.

12 *agosto.* — Temperatura rettale 38°. 2'. Iniezione intravenosa di 10 cmc. di una cultura in brodo di 24 ore.

Poco dopo l'iniezione l'animale cade in preda ad un forte tremore generale: presenta vomito, diarrea e tenesmo vescicale. Dopo circa un'ora non può reggersi sulle zampe, si manifesta la dispnea, il tremore aumenta, si getta al suolo e cade in coma.

13 *agosto.* — L'animale trovasi sempre nella stessa posizione del giorno precedente e presenta gli stessi sintomi. La temperatura rettale è 39°. 7'; urina molto, e si manifesta un catarro acuto delle congiuntive e del naso. Non tocca gli alimenti.

14 *agosto.* — Segue lo stato comatoso e il digiuno, come nei giorni precedenti.

15 *agosto.* — Peso kg. 8.400; le condizioni generali peggiorano, l'adinamia ed il digiuno sono completi, la diarrea è profusa, però l'animale riesce a trangugiare un po' d'acqua e vomita assai di rado. Rimane in questo stato durante 9 giorni, cioè sino al 21 agosto, epoca in cui si manifesta una cheratite bilaterale; entrambe le cornee sono affatto opache e infiltrate di pus. Segue tuttavia lo stato comatoso, interrotto solo da continui e violenti colpi di tosse rantolosa.

L'esame delle urine dimostra la presenza di una grande quantità di albumina.

23 *agosto.* — L'animale è affatto cieco e non riesce ancora a tenersi sulle zampe; oltre alla cheratite ed alla *bronco-pneumonite* si manifesta una *corizza* acuta e violenta che impedisce la respirazione per le narici; il cane è obbligato a respirare a bocca aperta, e poichè si trova disteso al suolo in uno stato di sonnolenza continua, così la chiusura istintiva e continua delle mascelle determina ad ogni istante violenti attacchi di asfissia, seguita da accessi di dispnea. Comincia a prendere qualche alimento.

Dalle narici esce un'abbondante essudazione catarrale, color verde chiaro. Suppongo la presenza di pigmenti biliari nel sangue e pratico un piccolo salasso dalla giugulare; il siero separato dal coagulo è *lattescente* e di un colore *verde oliva*. Questo colore verde oliva è proprio del siero dei convalescenti o di alcuni ammalati di febbre gialla, nei quali l'ittero è molto sviluppato.

27 *agosto.* — Peso kg. 6. 800. Temperatura rettale 39°. 2′: l'occhio destro è guarito dalla cheratite, ma il sinistro presenta tuttora la cornea infiltrata con pus nella camera anteriore.

1 *settembre.* — Peso kg. 7. 020. La temperatura è ritornata quasi normale (38°. 7′), ma le condizioni generali dell'animale sono sempre cattive. Se ne sta sempre disteso al suolo; la tosse è continua, il catarro nasale è sempre più abbondante, la respirazione è oltremodo dispnoica, la debolezza è estrema. In tale stato segue quasi invariato sino al

15. *settembre.* — Peso kg. 7. 540. Temperatura rettale 38 5′. Le articolazioni delle estremità anteriori sono tumefatte, infiammate e dolorose. L'esame delle orine dimostra sempre grandi quantità di albumina. Però le condizioni generali non accennano a migliorare se non verso il 28 settembre, cioè 46 giorni dopo il principio della malattia.

A poco a poco il cane comincia a muoversi e a nutrirsi più abbondantemente, non ha più febbre e gli occhi sono completamente guariti. Persistono tuttavia le tumefazioni articolari.

Ai 14 ottobre successivo, cioè 63 giorni dopo l'iniezione del virus e 16 giorni dopo l'entrata in franca convalescenza, pratico un nuovo salasso e separo dal coagulo un siero *lattiginoso* (analogo a quello segnalato recentemente nell'uomo nefritico) ma senza pigmenti e dotato di un debole potere preventivo negli animali.

Il cane rimase successivamente in vita e fu destinato alla vaccinazione. Al 9 marzo 1897, cioè dopo 7 mesi, pesava già Kg. 14.800 aveva ricevuto complessivamente per iniezione intravenosa 300 cmc. di cultura in brodo e parecchie culture su gelosio.

Esperimento II. — Cane giovane di Kg. 5.120.

1 *settembre.* Temp. rettale 38°.6′. Iniezione intravenosa di una cultura su gelosio diluita in 1 cmc. di cultura in brodo.

Subito dopo l'iniezione il cane comincia a vomitare tutto il contenuto gastrico e dopo un'ora circa cade in coma profondo.

Muore nella notte dello stesso giorno.

Autopsia: nella *cavità toracica*, nulla di notevole; *cavità addominale*, *milza* e *fegato* molto congesti, *stomaco* dilatato e riempito di liquido sanguinolento; la mucosa gastrica è tumefatta e talmente congesta che presenta il colorito *rosso-vinoso*, caratteristico della gastrite acuta generale. Tutto il tratto intestinale presenta la mucosa ugualmente tumefatta, arrossata e del medesimo colore della mucosa gastrica; in molti punti si osservano ecchimosi, ed il contenuto dell'intestino tenue è rappresentato da enorme quantità di muco e di sangue.

Si tratta di una vera enterite emorragica delle più gravi.

Le *culture* dimostrano la presenza del *bac. icteroide* in tutti gli organi e in quantità innumerevole.

Esperimento III. — Cane di Kg. 7.800.

2 *settembre*. Ore 11 ant. Iniezione intravenosa di una cultura su gelosio diluita in un cmc. di brodo-cultura.

Ore 1 pom. : il cane ha vomitato abbondantemente, sta accovacciato e presenta una respirazione accelerata e dispnoica.

Ore 2 pom. : trovasi sempre disteso e si lamenta di continuo, agitato da un tremore generale. Le mascelle sono aperte e dalla lingua pendente scorre abbondante del liquido gastrico misto a sangue.

Si manifesta fotofobia intensa.

A ore 2.30 il cane continua ad emettere grida lamentevoli, è completamente prostrato, allunga il collo per respirare più liberamente, quasi fosse minacciato da asfissia ; appare diarrea sanguigna.

A ore 2.40 muore.

Autopsia : *cavità toracica :* polmoni con macchie ecchimotiche : *cavità addominale : milza* un po' congesta, *fegato* con numerose macchie giallognole; l'esame microscopico praticato a fresco mercè l'impiego dell'acido osmico, dimostra le cellule epatiche già ricche di gocce di grasso ; i *reni* sono congesti ; lo *stomaco* presenta la mucosa straordinariamente tumefatta e così congesta che mostra un colorito generale rosso-vinoso marcatissimo ; gli *intestini* lungo tutto il loro percorso presentano la mucosa di un colorito scarlatto, tumefatta, ricoperta di essudazione catarrale e in molti punti emorragica; osservate esternamente le pareti intestinali, non presentano nulla di abnorme.

Le *culture* dimostrano la presenza di grandi quantità di bacilli icteroidi in tutti gli organi, ma sopratutto nella milza.

Esperimento IV. — Cane di Kg. 8.

3 *settembre*. Ore 11 ant. Iniezione intravenosa di 5 cmc. di brodo-cultura.

Ore 1 pom. l'animale è triste, in preda a tremore generale ed a violenti conati di vomito. Ha già svuotato completamente tutto il contenuto gastrico (circa 1000 gr. di alimenti semi-digeriti).

Ore 6 pom. : i conati di vomito si fanno meno intensi, ma l'animale è completamente prostrato di forze.

Le condizioni generali sono migliorate, ma seguita l'adinamia e la completa astinenza dagli alimenti.

Nei giorni successivi non si nota nulla di nuovo nello stato generale sempre cattivo. La diminuzione del peso del corpo è però progressiva e costante. Il 15 settembre il peso è sceso a Kg. 6.440 e le deiezioni appaiono macchiate di sangue.

19 *settembre.* Il peso è ancora disceso a Kg. 5.540 e cominciano a presentarsi continue enterorragie, le quali si ripetono nei giorni successivi, sino al giorno 25 in cui l'animale muore, avendo diminuito di peso sino a Kg. 5.040.

Autopsia: *cavità toracica:* i *polmoni* sono normali; il *sangue* del cuore assai spesso e semi-coagulato presenta una consistenza ed un colorito simile al catrame di Norvegia; *addome:* il *fegato* è di color *foglia morta* con numerossime macchie di varia grandezza colore *giallo chamois.*

L'esame microscopico a fresco mercè l'acido osmico, non solo rivela *tutte le cellule epatiche* in preda ad una degenerazione grassa straordinariamente intensa e diffusa, ma molte e grosse gocce di grasso sono affatto libere e l'acido osmico finisce coll'annerire quasi tutta la preparazione; la *milza* è un po' grossa flaccida e spappolabile; i *reni* presentano i segni di una nefrite grave, con degenerazione grassa diffusa, visibile anche ad occhio nudo per l'aspetto quasi giallognolo del parenchima; la *vescica urinaria* è completamente contratta e contiene poche goccie di urina fortemente albuminosa; lo *stomaco* e gli *intestini* ripieni di un liquido color *caffè*; nelle parti superiori dell'intestino tenue la mucosa è ricoperta da un abbondante catarro color giallognolo; però, ad eccezione di alcuni punti più o meno colpiti da infiammazione catarrale, le pareti intestinali hanno un aspetto quasi normale.

Le *culture* dal sangue e dai visceri dànno per risultato la presenza di una grande quantità del *bac. icteroide* misto al *colibacillo.*

L'analisi chimica del sangue, rivelò una quantità di urea uguale al 4.27 ‰.

Esperimento V. — Cane di Kg. 3.630.

8 *settembre.* Ore 10 ant. Iniezione intravenosa di una cultura su gelosio diluita in brodo.

Due ore dopo l'iniezione, l'animale ha vomitato tutto il contenuto gastrico. A ore 4 pom. sta malissimo, soffre di fotofobia, vomita continuamente ed ha diarrea sanguigna: adinamia completa.

Muore durante la notte.

Autopsia: *torace:* congestione polmonare; *addome:* *milza* grande, nera, turgida, friabile; *fegato* esangue, asciutto, con zone di degenerazione grassa e con vari punti ecchimotici; nello *stomaco* si osserva la mucosa di un color rosso-vino e con vaste ecchimosi sottomucose presentanti l'aspetto della gastrite emorragica acutissima; tutto il *canale intestinale* presenta la mucosa nel medesimo stato, cioè tumefatta, color rosso vino, con molte ecchimosi e con tutte le note della enterite acuta da cianuro di potassio. Il contenuto intestinale è composto da straordinaria quantità di muco e di sangue; il grosso intestino è inoltre riempito da una grande quantità di materia vischiosa, color cioccolatte con strie sanguigne: i *reni* sono congesti; la *vescica* è contratta e vuota di urina.

Le *culture* dimostrano la presenza di grandi quantità di *bacilli icteroidi* negli organi e scarsa quantità nel sangue.

Esperimento VI. — Cane di Kg. 4.650.

9 *settembre*. Ore 10 antim. Iniezione intravenosa di 2 cmc. di brodo-cultura.

Alcune ore dopo l'iniezione l'animale comincia a presentare conati di vomito e finisce col rigettare tutto il contenuto gastrico, rimane alquanto abbattuto e adinamico, ma nei giorni susseguenti ritorna presso a poco nelle primitive condizioni generali soddisfacenti, malgrado che la temperatura persista a 40° per circa quattro giorni di seguito.

Anche il peso del corpo diminuisce sensibilmente.

19 *settembre*. Però dopo 10 giorni esso è disceso solo a Kg. 4.080 la febbre è del tutto scomparsa, lo stato generale è eccellente e perciò pratico una seconda iniezione endovenosa di altri 2 cmc. di brodo-cultura.

Dopo ciò il peso del corpo diminuisce di nuovo rapidamente, lo stato generale si aggrava, soprattutto l' adinamia si accentua sempre più ed il 24 compare la diarrea sanguigna. Al 26 l'animale è prostrato di forze e sta molto male, al 27 si trova disteso, immobile nella sua gabbia, in preda ad uno stato comatoso profondo, interrotto solo da gemiti e da accessi di dispnea.

28 *settembre*. Avviene la morte.

Autopsia : *torace* : *polmone* sinistro alquanto congesto, *sangue* del cuore in gran parte liquido e molto pallido. *Addome* : *fegato* grosso, asciutto, di color rosso tendente all'aranciato (simile al fegato fosforico) con molte macchie color giallo. L'esame microscopico a fresco dimostra una degenerazione grassa diffusa di tutte le cellule epatiche ; la *cistifellea* è intatta e contiene della bile oltremodo spessa, di color giallo-oro ; *milza* grossa, tumefatta, rosso oscura, spappolabile ; entrambi i *reni* presentano tutti i caratteri microscopici del *grosso rene bianco*, alla superficie si osservano varie macchie emorragiche, la sezione presenta il parenchima bianco-sporco, anemico, molto poco resistente ; la *vescica urinaria* è totalmente contratta e solo per mezzo di una pipetta riesco a raccogliervi alcune gocce di urina limpida, ma che coagula completamente al calore : la *mucosa gastro-intestinale* non presenta nè congestione nè iperemia di sorta, ma è tumefatta, color grigio-sporco ed in preda ad un evidente processo catarrale, il cui abbondante essudato riempie quasi completamente il tubo digestivo che è affatto vuoto di sostanze alimentari.

Le *culture* praticate dal sangue e dai vari organi dimostrano una quantità innumerevole di *bacilli icteroidi*.

Il sangue contiene il 3. 15 ‰ di urea.

Esperimento VII. — Cane di Kg. 3 330.

10 ottobre. — Ore 9 ant. Iniezione endovenosa 2 di cmc. di brodo-cultura. Nelle prime ore successive alla iniezione, l'animale presenta i soliti sintomi già segnalati nelle altre esperienze, cioè : adinamia, vomito, tenesmo vescicale e diarrea.

La temperatura da 38°. 6′ sale a 40°. 7′ e rimane tale sino al giorno 13. — Al 14 e 16 è a 39°. 7; — Il 16 risale a 40°. Siccome il 17 discende a 39°. 1′ pratico una nuova iniezione endovenosa di 5 cmc. di brodo di cultura.

18 ottobre. — Avviene la morte preceduta da *vomiti sanguigni* e da *enterorragie.*

AUTOPSIA: *torace:* nulla di rimarchevole; *addome*, il fegato è intensamente degenerato e cosparso di macchie pallide color « *foglia morta* ». L'esame microscopico a fresco, con acido osmico, dimostra una degenerazione grassa diffusa di tutte le cellule epatiche; la *milza* è ingrossata e presenta varia macchie di infarti sanguigni; i *reni* presentano le note della nefrite acuta assai intensa; la *vescica urinaria* è contratta e contiene alcune gocce di urina completamente albuminosa; lo *stomaco* è dilatato, la mucosa è tumefatta e di color rosso-sangue; gl'*intestini*, ripieni di catarro bianco-giallastro presentano pure la mucosa assai ispessita, color rosso-scarlatto.

Le *culture* dimostrano assenza di microbi nel sangue e nell'urina, scarsissimi nel fegato e pochi nella milza.

ESPERIMENTO VIII. — Cane di Kg. 4. 060.

15 ottobre. — Ore 9 ant. Temp. rettale di 38°. 5′. Iniezione intravenosa di 5 cmc. di brodo-cultura.

Dopo l'iniezione l'animale presenta i sintomi generali già descritti, però sul far della sera si ricompone alquanto.

Nei giorni successivi, malgrado una temperatura sempre oscillante fra 39°.7′ e 40°, e una costante diminuzione del peso del corpo, si presenta in condizioni generali soddisfacenti.

23 ottobre. — Però otto giorni dopo la inoculazione del virus, il cane comincia ad aggravarsi, presenta della diarrea, sonnolenza, fotofobia e *vomito color caffè.*

24 ottobre. — Cade in uno stato comatoso profondo ed il 25 muore.

AUTOPSIA: *torace*: i *polmoni* si presentano in alcuni punti ecchimotici, *addome:* il *fegato* è color giallognolo, sparso di macchie color *cuoio* naturale. L'esame microscopico a fresco con acido osmico, dimostra le cellule completamente riempite di piccole e grosse gocce di grasso; la *milza* è piccola, asciutta, consistente, con vari infarti emorragici; i *reni* presentano una nefrite parenchimatosa diffusa; la *vescica* è contratta e contiene circa 1 cmc. di urina fortemente albuminosa: lo *stomaco* e gli *intestini* sono riempiti del tutto da una gran quantità di liquido *color caffè*, che all'esame microscopico appare costituito da bacteri di varia specie, fiocchi di epitelio, globuli e pigmento sanguigno. La mucosa dell'intestino tenue, lungo tutto il percorso è tumefatta, di un color cioccolatte, con vaste ecchimosi e ricoperta da una patina mucosa, spessa, resistente, color rosso-caffè. In vari tratti le *placche di Peyer appaiono enormemente tumefatte, prominenti od ulcerate:* all'intorno di esse esiste una vasta ed intensa infiltrazione emorragica.

Le *culture* dal sangue e dai vari organi dànno per resultato la presenza del *bac. icteroide* misto allo *streptococco.* Quest'ultimo è in prevalenza nella milza e nel sangue, trovasi in minor quantità nel fegato e nei reni.

Il *sangue* contiene 2.46 $^0/_{00}$ di urea.

Lo *studio istologico delle lesioni anatomiche* ha una grande importanza nella febbre gialla sperimentale del cane, inquantochè i suoi resultati sono identici a quelli che si ottengono dallo studio delle lesioni anatomiche nella febbre gialla dell'uomo.

Nel cane, come nell' uomo, la steatosi degli organi e sopratutto della cellula epatica, rappresenta un' alterazione specifica e quindi costante.

Abbiamo già visto come sia facile verificare questa gravissima degenerazione grassa, anche con un semplice esame praticato a fresco.

Nelle sezioni di organi fissati in liquido di Flemming l' aspetto dei tessuti è perfettamente identico a quello che si osserva nell' uomo. Talvolta la steatosi del cane è ancora più grave di quella che io abbia potuto osservare nell' uomo.

Il *fegato* è, come si capisce, l'organo che rimane colpito in maniera elettiva. L'alterazione anatomica generale che richiama immediatamente l'attenzione, consiste in una dilatazione capillare, che in certi punti resulta talmente esagerata da simulare quasi un tessuto angiomatoso. Le sezioni dei vasi prendono forme svariatissime e irregolari, e nei punti di confluenza si trovano spesso grandi lacune. Le colonne epatiche interposte ai capillari sono ridotte talora a sottili trabecole, costituite da cellule fortemente alterate nella forma, per lo più diminuite di volume, torbide, granulose e in certe parti completamente disfatte e ridotte in ammassi globosi irriconoscibili. I nuclei delle cellule per lo più si colorano poco (colorazione alla safranina) e si presentano pallidissimi, talora rigonfiati, tal'altra atrofici. Il protoplasma cellulare è completamente alterato, ha perduto il suo aspetto granuloso e presenta una degenerazione grassa talmente grave e diffusa, che ha solo riscontro in quella che si osserva nell'uomo o negli avvelenamenti da fosforo. Tutte le cellule sono colpite in vario grado.

In alcune la degenerazione si manifesta sotto forma di piccole granulazioni nere, in altre appaiono come grosse gocce di grasso che finiscono col riempire tutto il reticolo cellulare, in altre infine la steatosi è così completa che la intiera cellula è rappresentata da una macchia nera uniforme, a contorni alquanto sinuosi e talvolta con un foro circolare nella parte centrale, che rappresenta il nucleo incoloro o distrutto. L'aspetto di queste *cellule grasse* può parago-

narsi a quello di talune cellule nervose colorate in nero col metodo osmio-bicromico del Golgi.

Osservando le sezioni a piccolo ingrandimento, la intensità del processo steatogeno resulta ancora più chiara. Il tessuto epatico appare costituito come da un reticolo irregolare, costituito dagli elementi epatici le cui maglie si presentano, talora per lungo tratto, completamente annerite dall'acido osmico; cosicchè, la preparazione assume un curioso aspetto che la figura annessa può far comprendere meglio di ogni altra descrizione.

Si tratta di intiere serie di cellule epatiche completamente trasformate in un ammasso di sostanza grassa, la quale talvolta conserva la forma delle cellule primitive, tal' altra si riduce in una serie di grosse gocce di grasso.

L'analogia di questo processo steatogeno dovuto al *bac. icteroide*, con quello prodotto dall'avvelenamento fosforico, non potrebbe essere più evidente. Per stabilire migliori confronti ho determinato, come nelle cavie e nei conigli, avvelenamenti fosforici anche nei cani, somministrando il veleno per via gastrica. Con mia vera sorpresa ho osservato che in due cani avvelenati con fosforo e morti all' incirca 2 giorni dopo la somministrazione del veleno, la steatosi del fegato era molto meno accentuata di quella che si osserva nella infezione icteroide. Infatti, le gocce di grasso erano molto scarse e si vedevano distribuite fra le cellule epatiche anzichè nella stesso protoplasma. La cellula epatica apparve in generale molto più rispettata.

Dopo il fegato, nella infezione icteroide del cane, meritano di esser presi in considerazione i *reni*.

Quivi pure il processo degenerativo assume proporzioni assai gravi, quantunque meno accentuate che nel fegato.

Le cellule dei canalicoli urinarii sono, in generale, ora torbide e granulose, ora omogenee od in forma di zolle. In molte parti l'epitelio è in preda ad un vero e proprio processo di necrosi, per cui esse appaiono completamente disfatte e senza nucleo.

Il lume dei canalicoli urinarii contiene spesso cilindri epiteliali, leucociti, cilindri jalini e ganulosi, formati da albumina trasudata e da cellule disfatte.

La maggior parte dei nuclei preesistenti mostrano una spiccata incapacità a colorarsi. Si osservano spesso, come nel fegato, figure

nucleari bizzarre, imputabili senza dubbio a processi di cariolisi. La degenerazione grassa non è così grave e generalizzata come nel fegato, ma è in certi punti così spiccata, che si osservano talvolta intiere sezioni di canalicoli, il cui epitelio necrotico è disseminato di una immensa quantità di gocce di grasso di tutte le dimensioni. In tal caso la degenerazione adiposa assume lo stesso aspetto che è stato già descritto da vari autori nella intossicazione difterica grave.

I glomeruli sembrano, invece, assai meglio conservati, ma, come abbiamo già verificato nell' uomo, la capsula contiene spesso delle masse jaline e granulose, costituite evidentemente da albumina coagulata.

Il tessuto connettivo interlobulare pare che partecipi in generale ben poco al processo tossico, però i suoi vasi sanguigni sono sempre abnormemente dilatati. Oltre a ciò, in alcuni punti della preparazione, si osservano infiltrazioni parvicellulari, intertubulari a focolaio, riconoscibili anche a piccolo ingrandimento.

L'esame dei *reni* nell'avvelenamento fosforico dei cani, all'opposto di quanto abbiamo osservato per il fegato, dimostra lesioni degenerative molto più accentuate di quelle che si riscontrano nella infezione icteroide. Infatti, la maggior parte dell'epitelio renale resulta poco alterato, ma si trovano alcuni canalicoli talmente degenerati per cui nelle sezioni fissate previamente con acido osmico, appaiono come se fossero riempiti completamente da una quantità innumerevole di gocce di grasso d'ogni dimensione.

In quanto alla *milza*, ad eccezione di alcune rare cellule ripiene di goccioline di grasso, l'esame istologico non rivela nulla che possa costituire un reperto importante per le nostre ricerche.

L'esame istologico della *mucosa gastro-intestinale* presenta un grande interesse nella febbre gialla del cane perchè, come abbiamo descritto, le sue alterazioni macroscopiche sono quelle che si avvicinano di più alle alterazioni della febbre gialla umana.

Le lesioni gastriche, soprattutto, debbono richiamare la nostra attenzione. La superficie della mucosa gastrica si trova sempre, come nell'uomo, ricoperta da una patina composta di muco, di elementi epiteliali degenerati e di leucociti. L'epitelio cilindrico dei vestiboli glandulari e della superfice interna dello stomaco, in alcuni punti è mancante e nel resto presenta i gradi più elevati della metamorfosi mucosa.

Le singole cellule presentano, infatti, nel loro bordo libero altrettanti rigonfiamenti sferici terminali, che rimangono lievemente colorati in rosa con la safranina e che dànno, nel loro insieme, un aspetto così bizzarro a tutta la superficie della mucosa, per cui questa sembra ricoperta da organi simili ai conidii di un aspergillo.

L'epitelio delle glandole peptogastriche apparisce più granuloso del solito e il connettivo interglandulare presenta i vasi sanguigni così straordinariamente ripieni e sfiancati che in taluni punti sono lacerati e hanno dato luogo ad estese infiltrazioni emorragiche sottomucose, in mezzo alle quali trovansi anche alcuni grandi elementi connettivi, ripieni di gocciolette adipose.

***

La febbre gialla sperimentale nei cani riproduce quindi un quadro morboso, che non solamente dal punto di vista sintomatologico ed anatomico presenta le più strette analogie con la febbre gialla dell'uomo, ma ci aiuta mirabilmente ad interpretare certi fatti, che in quest'ultima potevano considerarsi sin qui come di difficile spiegazione.

Infatti, cominciando dal *vomito*, che rappresenta il sintomo culminante della infezione icteroide, noi vediamo che esso nel cane si determina in maniera costante, ogni qualvolta entri in circolo il veleno amarilligeno. Questo funzionerebbe quindi nell'organismo come un principio emetico assai attivo, paragonabile per es. all'apomorfina.

In quanto alle *gastrorragie* ed alle *enterorragie* appare evidente nei cani la loro origine dalle gravi alterazioni che si verificano lungo tutta la mucosa del canale digestivo.

Questa mucosa, infatti, sempre per effetto del veleno amarilligeno circolante nel sangue, cade in preda a processi dapprima congestivi e quindi necrotici, così gravi e diffusi, per cui la consecutiva rottura delle pareti vasali spiega più che a sufficienza le conseguenti emorragie.

Si tratta, anche in questo caso, di una funzione eminentemente emorragipara del veleno specifico, avente il suo punto di elezione sopratutto sulla mucosa gastrica, e sotto certi rapporti paragonabile a quella che è stata descritta da me e da altri osservatori per alcuni veleni microbici (veleno tifico, piocianico, ecc.) o per certi veleni del sangue (cianuro di potassio, ecc.).

Anche l'*ittero*, che non si riesce mai a provocare con alcun mezzo nei piccoli roditori, noi abbiamo potuto osservarlo in un cane.

È certo che questa manifestazione così comune nell'uomo, incontra difficoltà a riprodursi regolarmente negli animali; ma la patogenia di questo sintoma non è stata ancora ben definita in patologia. È supponibile che sia in relazione con la lesione e la conseguente dislocazione delle cellule costituenti la travatura epatica e che perciò debba considerarsi come un *ittero* da riassorbimento.

Però io stesso debbo confessare che mi è occorso ciò che ho visto essere occorso anche ad altri ricercatori, vale a dire che tanto nelle sierosità come nelle urine di animali e di individui completamente itterici o morti di febbre gialla, non mi è riuscito il più delle volte, nemmeno impiegando i procedimenti più delicati, a porre in evidenza la reazione del pigmento biliare.

Ciò torna forse in appoggio alla opinione di vari osservatori, secondo i quali l'ittero della febbre gialla non sarebbe dovuto ad una suffusione biliare, ma alla stessa materia del sangue trasformata in *emafeina*?

Nel dubbio, credo per ora opportuno sorvolare su questo punto, per fermare piuttosto l'attenzione sulle alterazioni renali che rappresentano nei cani, come nell'uomo, una parte così preponderante dell'intiero quadro morboso.

Infatti, dopo l'elemento epatico, l'elemento renale rappresenta nel cane, come nell'uomo, il punto più vulnerabile dell'intiero organismo.

I processi infiammatorii e degenerativi vi raggiungono una intensità così eccezionale per cui spiegano, senz'altro, dapprima l'albuminuria e quindi l'anuria che preannuncia quasi costantemente la morte. Quest'ultima è preceduta d'ordinario, così nel cane come nell'uomo, da un periodo comatoso, più o meno lungo, dovuto in parte anche alla intossicazione uremica che si aggiunge alla intossicazione amarilla. Il sangue dei cani contiene infatti, dopo la morte, quantità di urea assai rilevanti (4. 27 — 3. 15 — 2. 46 ‰) e presso a poco uguali a quelle che si riscontrano nei casi più gravi di febbre gialla nell'uomo.

Dal lato anatomico abbiamo ben poco da aggiungere a ciò che fu descritto nel riassunto delle nostre osservazioni istologiche.

La steatosi generale degli organi, soprattutto del fegato e dei reni, stabilisce fra la febbre gialla del cane e quella umana,

rapporti così stretti, costanti e specifici, per cui possiamo addirittura proclamarne l'assoluta identità.

È infine notevole le estrema rapidità dell'azione del veleno icteroide sulla cellula epatica, la quale può presentare, anche dopo poche ore, una degenerazione grassa pronunciata (vedi Esp. III).

Ciò che non mi è riuscito stabilire nettamente nei cani, è la dose mortale fissa, capace di produrre quel processo morboso ciclico, così caratteristico e così analogo a quello umano, che abbiamo descritto nelle cavie e nei conigli; ma questa difficoltà si spiega facilmente, tenendo presenti quelle considerazioni che abbiamo fatte più sopra rispetto alla impossibilità di ottenere sempre animali della medesima grandezza, della medesima età e della medesima razza.

Un ultimo resultato che richiama la nostra attenzione nella febbre gialla dei cani, è infine il *reperto bacteriologico*.

Nella maggior parte dei casi il *bacillo icteroide* si ritrova nel sangue e negli organi in quantità variabile, ma allo stato di assoluta purezza. Talvolta però trovasi associato, come nell'uomo, al *colibacillo* od allo *streptococco*.

Siccome questa tendenza alle invasioni microbiche secondarie noi la rileveremo a suo tempo, studiando la intossicazione amarilla nei cani, ottenuta colle sole culture filtrate e come d'altro canto non è imputabile a fenomeni postmortali, perchè le autopsie erano eseguite sempre poco dopo la morte, così deve conchiudersi che il veleno amarilligeno, sia per sè stesso, sia per le alterazioni che provoca nei varii visceri e soprattutto nel fegato, favorisca le infezioni secondarie, aventi forse il loro punto di partenza nello stesso canale intestinale. Il fegato è infatti universalmente considerato come un organo di difesa contro i microbi.

Ciò costituisce un importante punto di contatto microbiologico, fra le febbre gialla del cane e quella dell'uomo.

Considerando quindi l'insieme dei risultati che si ottengono nello studio della infezione amarilla nei cani, resulta che è possibile ottenere in questi animali i sintomi e le lesioni principali che costituiscono il quadro morboso specifico nell'uomo (1).

---

(1) Questa caratteristica fenomenologia provocata dalla infezione icteroide nei cani, troverebbe esatto riscontro in alcune interessanti osservazioni di vari autori, i quali durante gravi epidemie di febbre gialla avrebbero osservato pre-

E) L'infezione amarilla nelle scimmie.

La scimmia mi è sembrato un animale alquanto infedele nella sperimentazione del virus icteroide.

Sopra sette animali inoculati sotto la cute con 1 cm. c. di brodo-cultura, solamente tre sono morti, dopo 8 giorni precisi di malattia.

Gli altri quattro, dopo aver presentata una intensa tumefazione nel punto d'innesto e un dimagramento notevole, senza essere però accompagnato da alcun altro sintomo caratteristico, si sono ristabiliti completamente.

Siccome ciascun reperto delle tre esperienze con resultato positivo presenta qualche particolare degno di nota, così credo utile riassumerle brevemente.

Esperienza I. — Scimmia del Paraguay (*Cebus fatuellus)*, di gr. 540.

6 maggio 1896. Iniezione sottocutanea di 1 cm. c. di brodo — cultura di 24 ore.

Qualche ora dopo l'inoculazione l'animale si trova triste e la temperatura che normalmente oscilla fra 38°.4'-38°.8', raggiunge 39°.9' ed il mattino seguente 40°.1.

Comincia un rapido dimagramento diario e al 14 dello stesso mese, cioè all'8° giorno di malattia, muore in coma, dopo un lungo periodo agonico, caratterizzato da regurgito del contenuto gastrico e da qualche po' di enterroragia. Ecco il risultato dell'autopsia:

Peso del cadavere gr. 470: nulla di notevole nella cavità torarica. *Addome: fegato* tumefatto, congesto e molto friabile; l'esame microscopico a fresco rivela soltanto la presenza di una degenerazione granulare diffusa di tutte le cellule epatiche: congestione e tumefazione della *milza* e dei *reni*: *canale gastro-intestinale* quasi normale, con qualche ecchimosi della mucosa; scarsa urina limpida e priva d'albumina nella vescica urinaria.

Il reperto bacteriologico fu il seguente: le culture ottenute dal sangue erano costituite quasi completamente dallo *stafilococco aureo;* quelle dal fegato, dalla milza, dai reni e dall'urina, resultarono miste di *stafilococco aureo* e di *bacillo icteroide*, in quantità presso a poco uguale.

Il pericardio ed il peritoneo erano sterili.

---

sentarsi in questi animali tutti i sintomi della malattia, compreso il vomito di sangue (vedi: Goyzales: *Ueber das gelbe Fieber, welches in Cadix*, ecc. *Ubeers v. Borges*, 1805- Imray: *Edimburg med. a. surg. Journal* vol. 53, 64, 70 (1840-48), e Blair: *Some account on the last yellow fever epidemic of Brit. Guiana*, London 1850).

L'unico fatto meritevole di richiamare la nostra attenzione in questo caso così poco dimostrativo è la infezione mista riscontrata all'autopsia. Non potendosi trattare di infezione post-mortale, perchè l'autopsia era stata praticata immediatamente dopo la morte dell'animale, resta a concludersi che anche nella scimmia, come nell'uomo e nel cane, l'infezione icteroide predispone l'organismo alle infezioni secondarie da piogeni.

Esperienza II. — Scimmia come la precedente, di gr. 710.

1 dicembre. Iniezione sottocutanea di 1 cm. c. di brodo-cultura di 26 ore.

L'animale muore al 7° giorno, dopo aver diminuito progressivamente di peso sino a 580 grammi.

Autopsia (eseguita immediatamente dopo la morte).

Torace: polmoni in parte sani ed in parte fortemente edematosi; abbondante trasudato sieroso nella cavità pleurica destra, *cuore* flaccido quasi esangue degenerato. *Addome*: *stomaco* ed *intestini* ripieni di liquido diarroico, ma di aspetto quasi normale: *fegato* di *color giallo, completamente esangue, simile ad un ammasso di burro.* Solamente verso i bordi si osserva una finissima variegatura color rosso, delineante a guisa di delicata arborescenza gli spazi interlobulari.

L'esame a fresco con acido osmico dimostra *una completa degenerazione grassa di tutte le cellule epatiche*; la *milza* è un po' tumefatta ma di aspetto normale; i *reni* sono talmente pallidi ed esangui che danno l'impressione del grosso rene bianco; la *vescica urinaria* è contratta e contiene solo 2 o 3 gocce di urina torbida, lattescente, che coagula completamente al calore; i *gangli linfatici* ascellari e inguinali sono tumefatti.

Il risultato bacteriologico fu il seguente: scarsa quantità di *bacillo icteroide* nel sangue e nei reni, abbondante nel fegato, innumerevole nella milza, assente nell'urina.

Il particolare saliente di questa autopsia fu dunque una *steatosi del fegato così intensa e generale, come io non aveva mai osservato nè nel cadavere umano nè durante il corso di tutte* le mie precedenti esperienze negli animali.

Dopo averlo fissato in soluzioni di formaldeide e di alcool, conservo tuttora questo viscere col medesimo aspetto e colore in una miscela di glicerina ed acqua.

Esperienza III. — Scimmia come la precedente, di gr. 850.

3 dicembre. Iniezione sottocutanea di 1 cm. c. di brodo-cultura di 24 ore.

L'animale diminuisce rapidamente di peso, presentando come il precedente una elevazione febbrile marcata (3 ,° 8') durante le 48 ore e finisce col morire al 14° giorno (17 dicembre) senza presentare nessun sintoma meritevole di essere rilevato.

Autopsia (eseguita subito dopo la morte): peso del cadavere gr. 695.

Torace: *polmoni* alquanto congesti, trasudato citrino nelle pleure; *cuore* pallido, liquido pericardico aumentato, *Addome*: *stomaco* ed *intestini* pallidi, ma normali; *fegato* aumentato di volume, esangue, asciutto, di colore brunastro, con evidenti macchie di degenerazione grassa.

L'esame microscopico a fresco dimostra infatti delle gocce di grasso libere e una degenerazione granulo-grassa abbastanza pronunciata di tutti gli elementi epatici; la *milza* è di aspetto normale; i *reni* sono pallidi; la *vescica urinaria* contiene uu po' di urina chiara, ma albuminosa.

Le culture dimostrano la presenza del *bacillo icteroide* in grandi quantità nel sangue e nei visceri.

Il risultato di queste poche esperienze non può autorizzarci a tracciare il tipo morboso della febbre gialla nella scimmia; tuttavia l'eccezionale reperto anatomico della esperienza II, che indubbiamente potrebbe ripetersi, qualora si potesse sperimentare sopra un maggior numero di animali della medesima specie, ci rivela ancora una volta, con una dimostrazione delle più belle e delle più impressionanti, l'energico potere *steatogeno* del veleno icteroide.

Durante alcune ricerche comparative che ho voluto eseguire intorno alla intossicazione fosforica, ho avuto occasione di osservare, soprattutto nei cani e nei conigli, alcune degenerazioni grasse del fegato veramente notevoli, ma debbo dichiarare che nessuna di esse poteva paragonarsi, nell'aspetto esteriore, a quella osservata nella scimmia suddetta.

F) L'infezione amarilla nella capra e nel montone.

Non ho insistito con esperienze sistematiche su questi animali, perchè non ho creduto necessarie ulteriori conferme sperimentali affine di stabilire ed illustrare l'azione specifica del *bacillo icteroide*.

Tuttavia, non foss'altro a titolo di contributo, accennerò qui brevemente ad una capra e ad un montone, morti accidentalmente d'infezione generale nel corso di alcuni tentativi di vaccinazione che da tempo vado praticando negli animali.

Capra da latte, di Kg. 34.480.

Il 2 agosto cominciò ad essere inoculata sotto la cute con 1 cmc. di cultura filtrata. Successivamente la dose iniettata fu sempre maggiore, cosicchè il 20 ottobre aveva ricevuto in tutto 195 cmc. di toxina con una diminuzione di

peso di 4 Kg. circa. Dal 24 ottobre al 21 novembre l'animale ricevette la iniezione sottocutanea complessiva di 10 cmc. di brodo-cultura virulenta, che tollerò perfettamente bene. Il 24 novembre si inoculò per via endovenosa con 5 cmc. di una brodo-cultura. Al giorno seguente la capra cadde ammalata ed il 27 morì.

Il peso del cadavere era di Kg. 28.600.

AUTOPSIA. *Torace*: la cavità pleurica contiene gran quantità di un essudato sieroso, trasparente, giallognolo; i *pulmoni* sono straordinamente edematosi, il cuore è flaccido e degenerato. *Addome*: abbondante essudato sieroso nel cavo addominale; il canale digestivo è di aspetto normale, ma il *fegato* presenta tutti i segni di una degenerazione grassa, mediocremente diffusa; la *milza* è di aspetto normale; i *reni* presentano i caratteri di una *glomerulo-nefrite* molto intensa; la *vescica urinaria* è contratta e contiene poche gocce di un' urina torbida e molto albuminosa.

Le culture tanto dal sangue come dagli organi e dall'urina, resultarono una vera *purée* di microbi. Solamente gli essudati pleurico e addominale ne contenevano in iscarsa quantità.

L'analisi chimica dell'essudato pleurico rivelò la presenza di gr. 4.05 di urea per mille!

***

Montone giovane, di Kg. 22.800.

Il 5 settembre cominciò a ricevere, sotto la cute, piccole dosi di culture filtrate, che si andarono man mano aumentando sino al 10 ottobre, in cui l'animale era disceso al peso di Kg. 17.800, avendo ricevuto in tutto 115 gr. di toxina.

Siccome, ad onta della diminuzione di peso, l'animale presentavasi in condizioni generali ottime, il 12 ottobre gli si inocularono, per via sottocutanea, 10 cmc. di brodo-cultura virulenta.

Questa iniezione fu tollerata così bene che l'animale cominciò ad aumentare di peso; gli venne quindi ripetuta per otto volte successive, per cui al 21 novembre il montone aveva ricevuto la iniezione sottocutanea complessiva di 125 cmc. di cultura filtrata e 121 cmc. di cultura virulenta.

Il 24 novembre fu praticata un' iniezione endovenosa di 5 cmc. di brodo-cultura fresca, e siccome pareva che l'animale l'avesse ben tollerata, gli fu ripetuta alla dose di 10 cmc. il 1° dicembre.

Il giorno dopo il montone morì.

AUTOPSIA (eseguita subito dopo la morte).

Torace: essudato pleurico abbondante, di color giallo intenso; *edema pulmonare* straordinariamente sviluppato e diffuso. *Addome:* apparato digestivo di aspetto quasi normale, presentante solo brevi tratti di *enterite*, *fegato* pallido, ma apparentemente non degenerato; *milza* piccola e flaccida; *reni* molto congesti; *vescica urinaria* contratta e contenente poche gocce di urina limpida e priva di albumina.

Le *culture* dal sangue e dall'essudato pleurico resultarono sterili, quelle dal

fegato, dalla milza e dai reni resultarono miste di *bac. icteroidi* e di *streptococchi*: l'urina presentava in cultura pura lo *stafilococco aureo*.

L'analisi chimica dell'essudato pleurico dette il 2,80 $^{0}/_{00}$ di urea.

Il siero separato dalla coagulazione del sangue del cuore, produceva nella proporzione dell'1.20 ed in una sola ora, l'agglutinamento, l'immobilizzazione e la precipitazione di tutti i microbi di una brodo-cultura di 24 ore.

Si ripete quindi anche nella capra e nel montone il medesimo complesso di fenomeni che abbiamo segnalato come specifici in tutto il resto delle nostre ricerche di patologia comparata.

In queste due ultime esperienze, soprattutto nella seconda, è rilevante la poca intensità della steatosi epatica, ma ciò non può avere alcuna importanza, giacchè si trattava anzitutto di animali i quali erano da lungo tempo abituati a tollerare grandi quantità di veleno e di *virus* amarilligeno; in secondo luogo perchè il processo infettivo che fu la causa immediata della morte, si svolse in un periodo troppo breve, soprattutto nel montone, per poter determinare una degenerazione grassa considerevole del fegato.

Vedremo, infatti, nella seconda parte di questa memoria, che il veleno amarilligeno può determinare una steatosi profonda e generale delle cellule epatiche.

In quanto alla lesione renale, in entrambi i casi essa si é manifestata con tale gravità per cui può ritenersi che, specialmente nella capra, qualora la morte non si fosse verificata per intossicazione specifica, si sarebbe prodotta per insufficienza renale.

La enorme quantità di urea riscontrata soltanto nell' essudato pleurico (gr. 4,05 $^{0}/_{00}$) è infatti molto superiore a quella più elevata che gli autori (*Grehant*, etc.), hanno riscontrato negli animali morti per nefrotomia (2 gr. 76 $^{0}/_{00}$).

Ciò dimostra che anche nella febbre gialla sperimentale, l' organo che si mostra più sensibile al veleno specifico e la cui lesione funzionale costituisce un fatto clinico ed anatomico di capitale importanza è il rene.

VI.

Riassunto.

I risultati di questa prima parte di ricerche ci permettono ormai di potere stabilire alcune conclusioni fondamentali, circa la etiologia e la patogenia dclla febbre gialla.

La febbre gialla è una malattia infettiva dovuta ad un microrganismo ben definito e suscettibile di essere coltivato nei nostri ordinari mezzi nutritivi artificiali.

Questo microrganismo, che ho provvisoriamente designato col nome, non del tutto esatto, di *bacillus icteroides*, può isolarsi non solamente dal cadavere, ma ancora durante la vita dell'ammalato di febbre gialla.

Il suo isolamento presenta il più delle volte difficoltà quasi insormontabili, dovute in parte alla costante intromissione di infezioni secondarie e in parte alla relativa scarsità con cui si riscontra nell'organismo.

Tali infezioni secondarie sono dovute quasi sempre a determinate specie microbiche, come: il *colibacillo*, lo *streptococco*, gli *stafilococchi*, i *protei* etc., che possono irrompere nell' organismo anche molto tempo innanzi la morte del paziente, e non può escludersi che quest'ultima sia talora più imputabile ad èsse, che non all'azione del *bacillo icteroide*.

È probabile che una delle cause che imprimono un quadro oltremodo proteiforme alla febbre gialla nell' uomo, sia appunto dovuta alla natura ed alla maniera di svolgersi di queste infezioni secondarie.

L'infezione amarilla, tanto nell'uomo come negli animali inferiori, rappresenta una malattia a decorso ciclico. Durante questo periodo il microbio specifico si ritrova negli organi in grande scarsezza ed è solamente alla fine del ciclo morboso, il quale può stabilirsi intorno ai 7 od 8 giorni, ch'esso si moltiplica risolutamente ed invade quasi all'improvviso l'organismo intero, accompagnato quasi sempre da altri microbi, di probabile provenienza intestinale.

Solamente nei casi che terminano in siffatta maniera, vale a dire che compiono regolarmente il loro ciclo morboso, può ritrovarsi con

relativa facilità il microbio specifico diffuso nel sangue e negli organi.

Allorquando una setticemia intercorrente od un precoce avvelenamento uremico, pone termine anzi tempo a questo ciclo morboso, è sommamente difficile, se non del tutto impossibile, l'isolamento del *bacillo icteroide*

In altra occasione studieremo le cause di queste infezioni secondarie, che nella febbre gialla costituiscono quasi una regola con ben poche eccezioni.

Il *bac. icteroide* una volta penetrato nell' organismo, non solamente determina una intossicazione generale, ma produce alterazioni specifiche aventi sede elettiva soprattutto nei reni, nel canale digestivo e nel fegato.

In quest'ultimo viscere determina una rapida degenerazione grassa dell' elemento istologico; nel canale digestivo produce gli effetti di una gastro-enterite ematogena, nel rene produce la nefrite parenchimatosa acuta.

Siccome la lesione renale è una delle più precoci, così all'anuria, che ben presto si stabilisce negli ammalati di febbre gialla, deve imputarsi altra non trascurabile intervenzione nello sviluppo del quadro morboso e nella terminazione del medesimo (1).

L'ammalato di febbre gialla è infatti minacciato contemporaneamente da tre pericoli imminenti, ed il reperto bacteriologico del cadavere può, con una certa approssimazione, porre in evidenza la causa principale della morte.

1° Questa può considerarsi come dovuta alla infezione specifica principalmente, allorquando il *bacillo icteroide* si ritrova nel cadavere in una certa quantità ed allo stato di relativa purezza. Ciò avviene solo nei casi che percorrono sino alla fine il proprio ciclo morboso.

2° Può considerarsi prodotta dalle setticemie stabilitesi successivamente, durante il corso della malattia, allorchè il cadavere presenta il reperto di una cultura quasi pura di altri microbi.

---

(1) Questa grande importanza della lesione renale non era sfuggita a qualche antico osservatore. Infatti il *Lallemant* (*On the fever of Rio Janeiro. New Orleans*, 1854, pag. 276) per indicare la febbre gialla usava le espressioni: « tifo renale, influenza renale » etc.

3° Può esser dovuta anche in gran parte alla insufficienza renale, allorchè il cadavere si riscontra quasi sterile, il tasso dell'urea nel sangue è molto elevato, e il decesso si effettua avanti che la malattia abbia raggiunto la fine del suo ciclo evolutivo.

È difficile pronunciarsi, durante la vita del paziente, sulla prevalenza o no dei sintomi uremici su quelli specifici, perchè i sintomi più salienti della intossicazione amarilla si confondono facilmente con quelli della insufficienza renale.

Questa frequente e inevitabile complicazione è forse la causa principale che impedisce l'adozione di un tipo termico specifico della febbre gialla. È infatti molto probabile che certe temperature di apparenza normale e certe strane ipotermie che si manifestano con grande frequenza durante lo stato di delirio od in piena evoluzione del male e talune improvvise e inesplicabili terminazioni del processo morboso, anzichè all'azione del veleno amarilligeno, sieno dovute in massima parte all'intervento della intossicazione uremica.

Il così detto « *vomito negro* » è dovuto all'azione dell'acidità gastrica sul sangue che è stravasato nello stomaco, in conseguenza delle gravi lesioni tossiche della sua mucosa.

L'atto del vomito è provocato direttamente dall'azione *emetica*, specifica, che posseggono i prodotti tossici del *bac. icteroide*, circolante nel sangue.

Il carattere emorragico presentato dalla malattia è dovuto anzitutto alla *proprietà emorragipare* possedute dal *bacillo icteroide* in comune con altri microbi, ed in secondo luogo alle profonde e rapide degenerazioni grasse, specifiche, che esso produce nelle pareti vasali.

La ricerca e la identificazione del *bac. icteroide*, nei tessuti, non può aver valore se non dopo conosciuti i resultati bacteriologici dell'autopsia.

Il *bac. icteroide* possiede caratteri morfologici così netti che malgrado il suo grande *pleomorfismo*, lo fanno distinguere con molta facilità da tutti i microbi sin'ora conosciuti.

Una volta isolato, sia dal cadavere come dall'ammalato. la sua diagnosi bacteriologica esatta non richiede più di 24 ore.

Il *bac. icteroide* è patogeno per la maggior parte dei nostri animali domestici.

Nei *topi*, nelle *cavie* e nei *conigli*, riproduce una malattia ciclica, analoga a quella che osserviamo nell'uomo e la cui durata per i primi è di circa 5 giorni, per le seconde di 6-8 giorni, e per i terzi di circa 5 giorni.

Durante questa malattia, i microbi inoculati si moltiplicano assai scarsamente nell'interno degli organi. Solamente alla distanza di 24-48 ore avanti la morte, essi irrompono improvvisamente nel circolo sanguigno e finiscono con l'uccidere l'animale per setticemia.

È nel fegato dei conigli che si cominciano a constatare i primi effetti dell'azione steatogena del veleno icteroide.

La trasmissione della malattia può sperimentalmente ottenersi nelle cavie e nei conigli, anche per le vie respiratorie.

In tal caso il reperto bacteriologico depone spesso in favore di un processo tossico identico a quello che si verifica nell'uomo. È quindi possibile che il contagio del virus amarilligeno possa avvenire, in natura, anche per mezzo dell'aria.

Ciò starebbe d'accordo con la maggior parte delle opinioni dominanti in proposito.

Nei *cani*, il *bac. icteroide* determina un quadro sintomatico ed anatomico molto più completo e più analogo a quello che si osserva nell'uomo e cioè: vomito, ematemesi, ematuria, albuminuria, gastroenterite ematogena, nefrite, ittero, profonda degenerazione grassa del fegato, intossicazione uremica e comparsa di infezioni secondarie.

Nelle *scimmie* può produrre la malattia ciclica, una completa steatosi del fegato, infezioni miste ecc.

Nella *capra* e nel *montone* colpisce più profondamente i reni, determinando albuminuria ed intossicazione uremica. Produce inoltre degenerazione acuta specifica della cellula epatica e favorisce infezioni miste.

Il virus della febbre gialla possiede quindi 3 principali proprietà patogene le quali nel loro insieme contribuiscono a formargli una fisonomia propria che potrebbe considerarsi come specifica: 1ª *le proprietà steatogene*, che si manifestano con tanta maggiore intensità quanto più elevato nella scala zoologica trovasi l'animale su cui esse si esercitano. Appaiono, infatti, in grado minimo nel coniglio e raggiungono il *maximum* dei loro effetti nel cane, nella scimmia e nell'uomo. L'*ittero* che si manifesta in generale, allor-

quando la malattia è già inoltrata, è forse dovuto alle gravi alterazioni anatomiche del fegato, ove la ben nota dislocazione della travatura epatica deve costituire un vero ostacolo meccanico al libero deflusso della bile, favorendone perciò il riassorbimento per il sistema linfatico; 2ª *le proprietà congestive ed emorragipare*, che pur essendo comuni a varie altre specie di virus, tuttavia per le sedi anatomiche sulle quali esse si esercitano di preferenza, costituiscono un carattere specifico molto saliente, inquantochè debbonsi ad esse non solamente il classico *vomito di sangue (vomito negro)* e le altre svariate manifestazioni emorragiche da parte delle mucose, ma anche le congestioni vasali che sono la causa principale dei ben noti dolori patognomonici (cefalalgia, rachialgia, epatalgia, ecc.) della febbre gialla; 3ª *le proprietà emetiche*, che pur non essendo, al pari delle precedenti manifestazioni, strettamente specifiche del virus amarilligeno, tuttavia per la rapidità, la intensità e la insistenza con le quali sogliono manifestarsi nell'uomo e negli animali superiori (cani) imprimono a questo virus un carattere patogenetico oltremodo singolare e che lo rende facilmente differenziabile da tutti gli altri conosciuti sin'ora.

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE

Tavola I.

Culture piatte, su gelatina, del bacillus icteroides *recentemente isolato.*

Fig. 1. — Cultura sviluppata alla temperatura di circa 20° c. dopo 16 ore. Le diverse colonie appaiono finamente ed uniformente granulose (60 diam.).

Fig. 2. — La medesima cultura dopo 3 giorni. — Le colonie vanno a poco a poco aumentando di volume, ma nella maggior parte di esse non si delinea ancora la formazione del nucleo.

Fig. 3, 4. — Colonie tipiche, completamente sviluppate.

Fig. 5, 6. — Colonie reniformi: varietà oltremodo frequente in tutte le culture piatte in gelatina sviluppatesi normalmente.

Tavola II.

Fig. 1, 10. — Differenti culture su gelosio, ottenute per istrisciamento dal succo di vari organi e dal sangue, e sviluppate dapprima durante 12-24 ore nella stufa a 37° c. e quindi tenute alla temperatura della stanza durante vari giorni.

La fotografia della cultura n. 1 è stata eseguita dopo 18 ore di sviluppo nella stufa e 12 ore di sviluppo alla temperatura ambiente. Il *cercine* opaco sviluppatosi alla temperatura ambiente resulta appena delineato in bianco su qualche colonia.

Nelle rimanenti culture si rileva nettamente, a grandezza naturale, la parte centrale cresciuta a 37° c. e all'intorno di essa, più o meno abbondantemente sviluppata, la zona periferica, cresciuta alla temperatura ambiente. Le figure 5, 6, 8, 9 e 10 rappresentano delle culture straordinariamente caratteristiche del *bacillo icteroide.*

Fig. 11. — Rappresenta una cultura su gelosio ottenuta dopo vari giorni esclusivamente alla temperatura dell'ambiente (circa 18°-20°). In questo caso lo sviluppo delle colonie, quantunque cresciute distanti le une dalle altre, non presenta alcuna somiglianza con le culture precedenti

Fig. 12. — Rappresenta una cultura per strisciamento sviluppata alla temperatura della stanza. L'aspetto di essa è perfettamente identico al precedente.

Tavola III.

Diagnosi bacteriologica rapida del bacillo icteroide.

Fig. 1. — Cultura per striciamento su gelosio da (succo splenico) sviluppatasi per 12 ore oella stufa a 37° c.
Fig. 5. — La stessa cultura fotografata dopo essere rimasta per 5 giorni successivi alla temperatura ambiente di 18°-20° c.
Fig. 2, 3. — Culture per strisciamento su gelosio (per diluzione di una brodocultura) sviluppate per 18 ore nella stufa a 37° c.
Fig. 6, 7. — Le stesse culture fotografate dopo essere rimaste per 5 giorni successivi alla temperatura ambiente di 18°-20° c.
Fig. 4. — Cultura per istrisciamento su gelosio (per diluzione di una brodocultura) sviluppata per 12 ore nella stufa a 37° e per altre 12 ore alla temperatura ambiente di 20°. Si osserva già assai nettamente formato il *cercine* che si è andato sviluppando all'intorno delle colonie cresciute nella stufa.
Fig. 8. – La stessa cultura fotografata dopo essere rimasta ancora per altri 5 giorni alla temperatura ambiente. I *cercini* delle varie colonie sono andati aumentando in superficie sino a fondersi insieme ed assottigliando in pari tempo il loro spessore.

Tavola IV.

Preparazioni microscopiche del bacillo icteroide.

Fig. 1. — Cultura di 24 ore in brodo-lactosio al 2 %.
Fig. 2. — Cultura di 24 ore su gelosio.
Fig. 3. — Cultura di 24 ore in brodo di carne peptonizzato.
Fig. 4. — La stessa cultura dopo 10 giorni (forme d'involuzione).
Fig. 5. — Essudato peritoneale di una cavia morta per infezione generale, 6 giorni dopo l'iniezione peritonale di una brodo-cultura.
Fig. 6. – Ciglia vibratili del *bacillo icteroide* (da una cultura su gelosio, colorazione col metodo di *Nicolle Morax*).

Tavola V.

Colonie tipiche, originali, *del* bacillus icteroides,
sviluppate su culture piatte di gelatina.

Fig. 1, 7. — Colonie tipiche, normali, sviluppate alla temperatura di 18°-20° c.
Fig. 8, 10. — Varietà giovani alquanto atipiche, ma frequenti, delle stesse colonie.

Fig. 11. — Varietà adulta molto frequente.
Fig. 12. — Varietà reniforme allo stato adulto.
Fig. 13, 16. — Varie colonie rimaste stazionarie a diverse fasi di sviluppo.

Pleomorfismo presentato da 5 varietà del bacillus coli comunis.

A) 1ª — Varietà di *colibacillo* isolata su gelatina, dal contenuto intestinale di un soggetto morto di febbre gialla (cultura di 48 ore).
Fig. *a:* — Aspetto delle colonie di 48 ore, provenienti dalla stessa varietà *A*, e sviluppate su due placche differenti (I e II), seminate allo stesso tempo.
Fig. *b:* — Aspetto delle colonie di 5 giorni id. sulle medesime placche.
Fig. *c:* — Aspetto delle colonie di 15 giorni id., id.
B) 2ª — Varietà di *colibacillo* isolata come sopra (cultura di 48 ore).
Fig. *a:* — Aspetto delle colonie di 48 ore, provenienti dalla stessa varietà *B*, e sviluppatesi su due placche differenti (I e II), seminate allo stesso tempo.
Fig. *b:* — Aspetto delle colonie di 5 giorni id., nelle medesime placche.
Fig. *c:* — Aspetto delle colonie id., 15 giorni id., id.
C) 3ª — Varietà di *colibacillo* isolata come sopra (cultura di 48 ore).
Fig. *a:* — Aspetto delle colonie di 48 ore, provenienti dalla stessa varietà *C*, e sviluppatesi su due placche differenti (I e II), seminate allo stesso tempo.
Fig. *b:* — Aspetto delle colonie di 5 giorni id. nelle medesime placche.
Fig. *c:* — Aspetto delle colonie di 15 giorni id., id.

TAVOLA VI.

Colorazione dei bacilli icteroidi nei tessuti umani (Visceri dell'Oss. II).

Fig. 1. — Fegato umano esposto per 12 ore nella stufa a 37° e colorito col metodo di *Nicolle* (500 diam. Zeiss, Oc. c. 9, Obb. 2,0 mm.).
Fig. 2. — La stessa preparazione osservata a 1000 diam. (Zeiss, Oc. c. 8 Obb. 2,0 mm.).
Fig. 3. — La stessa preparazione osservata a 2250 diam. (Zeiss, Oc. c. 8, Obb. 2,0 mm.).
Fig. 4. — Rene umano a 1200 diam. (Zeiss, Oc. c. 12, Obb. 2,5 mm.).
Fig. 5. — Milza umana a 800 diam. (Zeiss, Oc. c. 8, Obb. 2,5 mm.).

TAV. VII.

Colorazione dei bacilli icteroidi nei tessuti del coniglio.

Fig. 1. — Fegato di un coniglio morto in 5 giorni per iniezione sotto-cutanea. Colorazione col metodo di NICOLLE, 750 diametri (Zeiss, Oc. c. 6 Obb. 2,0 mm.).
Fig. 2. — La stessa preparazione, a 1800 diametri (Zeiss, Oc c. 18. Obb. 2,5 mm.)
Fig. 3. — Milza dello stesso coniglio, a 1000 diam. (Zeiss, Oc. c. 8, Obb. 2,0 mm.).

Fig. 4. — Rene dello stesso coniglio, a 450 diametri (Zeiss, Oc. c. 6, Obb. ap. 3,0 mm.).

Fig. 5-6-7. — Fagociti ripieni di bacilli icteroidi, ritrovati nell'essudato peritoneale di una cavia morta dopo 5 giorni, in seguito ad iniezione sotto-cutanea. L'essudato non conteneva alcun microbio libero.

Fig. 8. — Preparazione per ischiacciamento dalla polpa splenica di un coniglio morto in 48 ore, al seguito di una iniezione endovenosa.

Questo genere di preparazioni, specialmente se colorate con violetto di genziana, si presta ottimamente per la dimostrazione degli spazi chiari nei microbi sviluppantisi nell'organismo animale.

Fig. 9. — Cultura di 24 ore in brodo lactosato eseguita direttamente dal sangue di un ammalato di febbre gialla (Oss. II), ove il *bac. icteroide* si trovava allo stato di purezza. Tutti i microbi presentano forme molto precoci d'involuzione.

Tavola VIII.

Alterazioni degenerative prodotte dal bacillo icteroide nei vari tessuti.

(Fissamento in liquido di Flemming, colorazione alla safranina, decolorazione con acido picrico).

Fig. 1. — Fegato umano (Oss. II) 750 diametri (Zeiss, Oc. c. 12, Obb. a 4,0 mm.).

Fig. 2. — Fegato di coniglio morto dopo 5 giorni, al seguito di una iniezione sotto-cutanea. 750 diametri (Zeiss, Oc. c. 12, Obb. a. 4,0 mm.).

Fig. 3. — Fegato di cane morto per infezione intravenosa. 175 diametri. (Koritska Oc. 3. Obb. 5).

Fig. 4. — La stessa preparazione a 750 diam. (Zeiss, Occ. c. 12, Obb. a 4,0 mm.).

Fig. 5. — Rene dello stesso cane a 1200 diametri (Zeiss, Oc. c. 12, Obb. a 2,0 mm.).

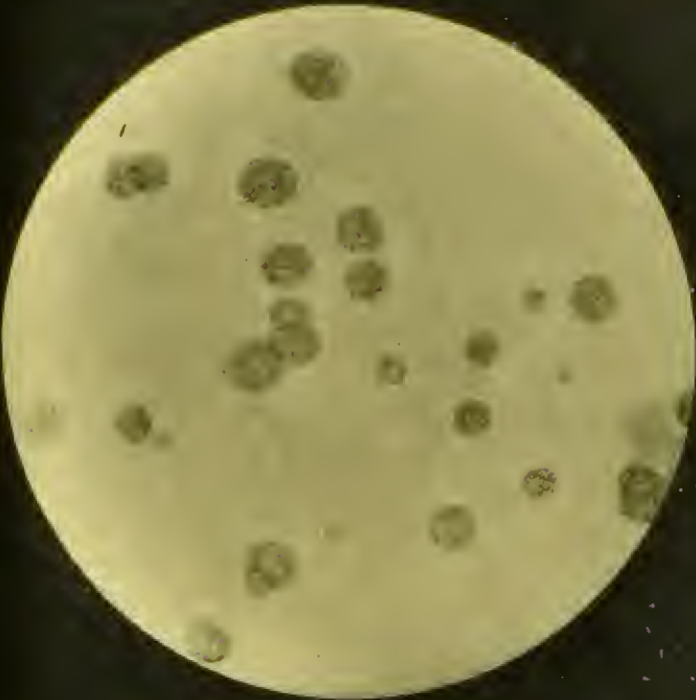
Fig. 6. — Degenerazione mucosa, desquamazione epiteliale e grave infiltrazione emorragica nello strato superficiale della mucosa gastrica in cane morto dopo 24 ore, per iniezione endovenosa: 1000 diametri (Zeiss, Oc. c. 8. Obb. ap. 2,0 mm.).

Tavola IX.

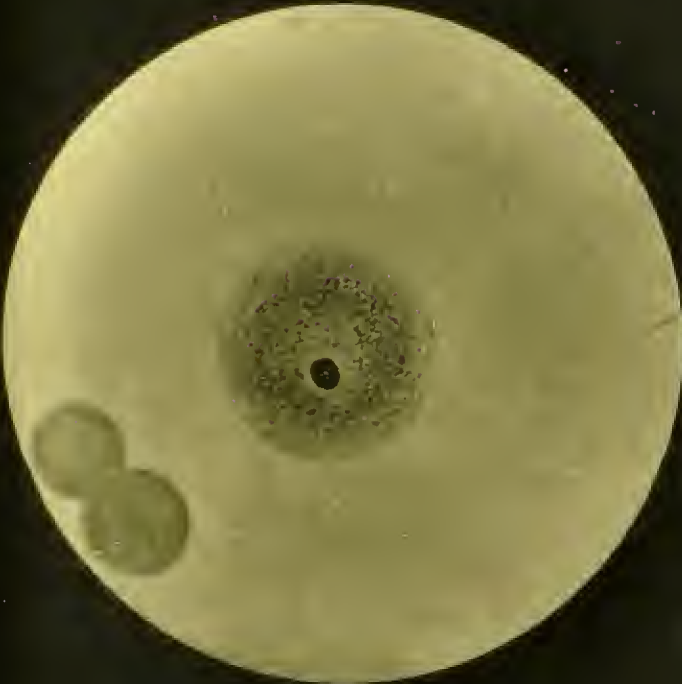
Fig. 1. — Fegato completamente degenerato in grasso appartenente alla scimmia della Esperienza II, morta dopo 7 giorni di malattia (Grandezza naturale).

Fig. 2. — Stato della mucosa gastrica nella infezione amarilla dei cani (gastrite ematogena).

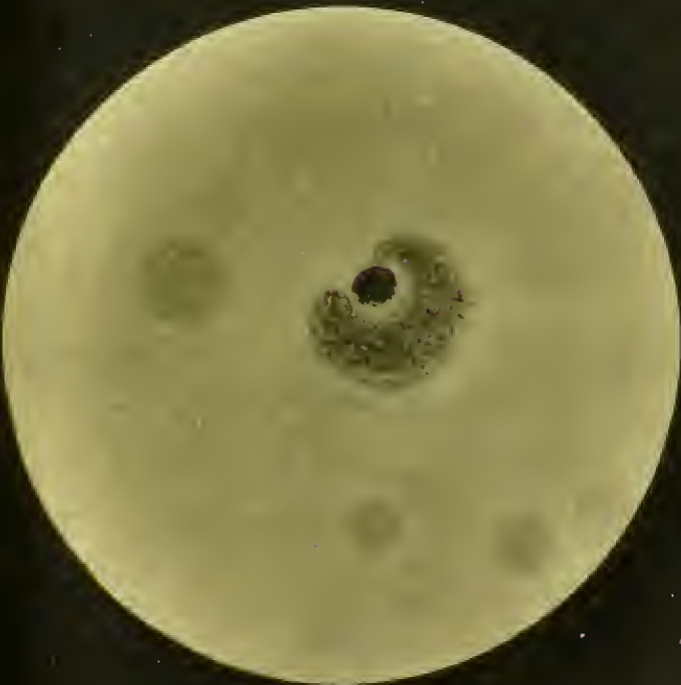
Fig. 3. — Stato della mucosa intestinale nella infezione amarilla dei cani (enterite ematogena).

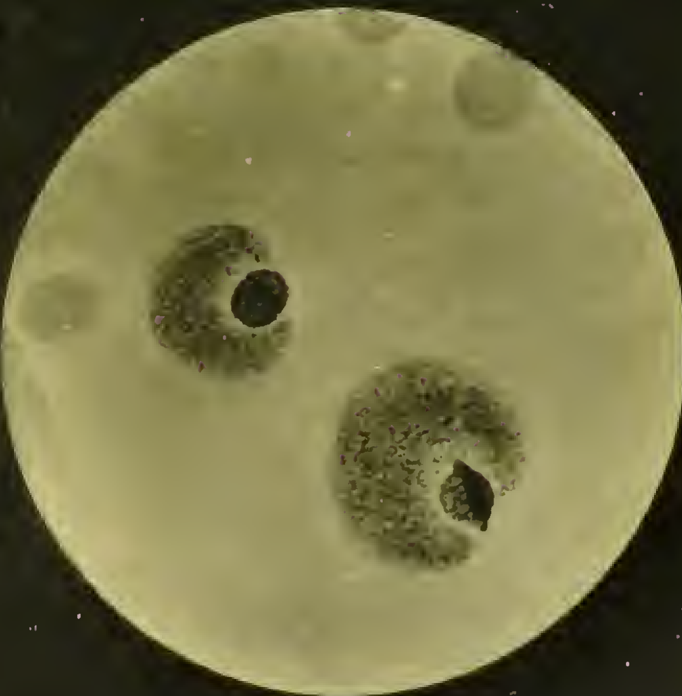

1.

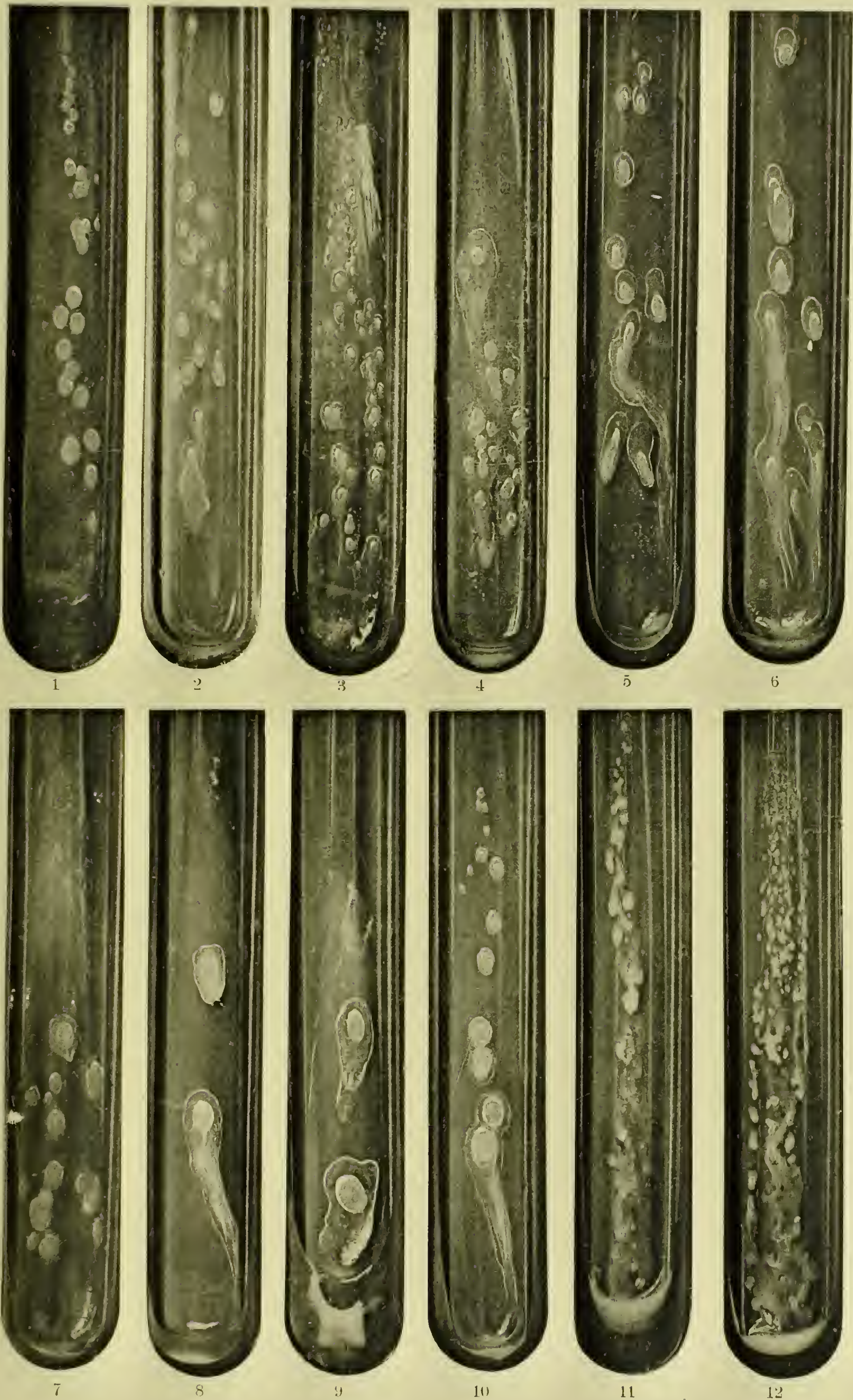

2.


3.


4.


5.


6.

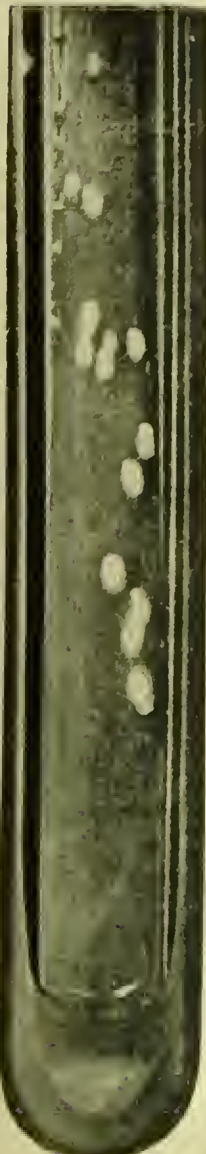


Sanarelli fecit


1


2


3

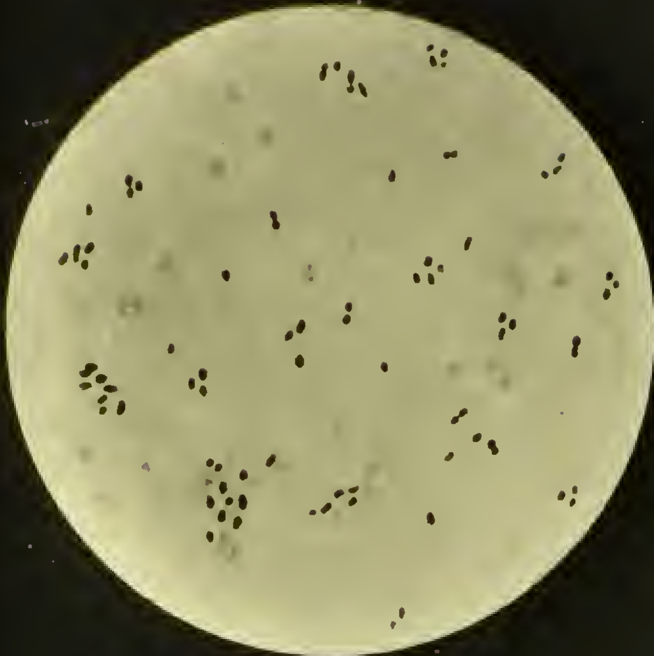

4


5

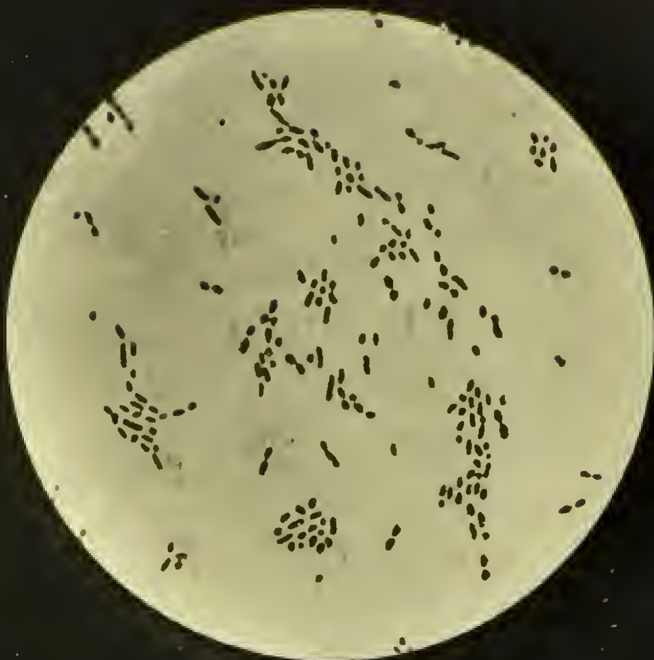

6


7


8



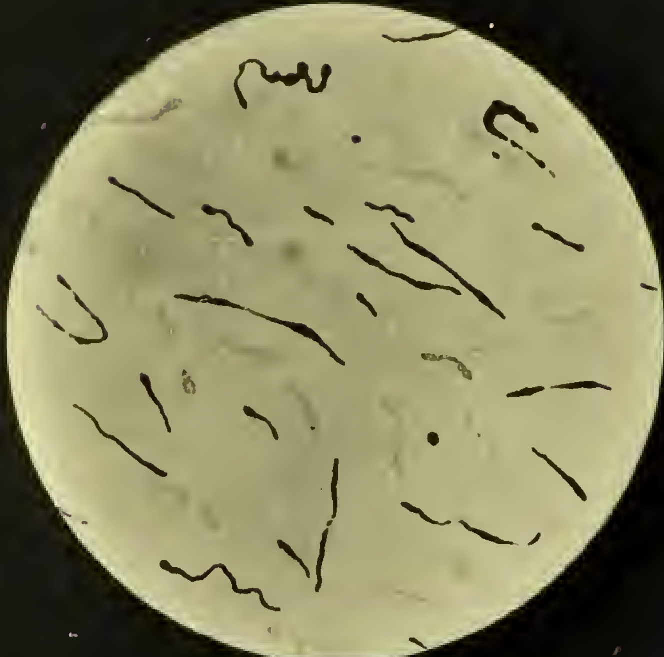
1.



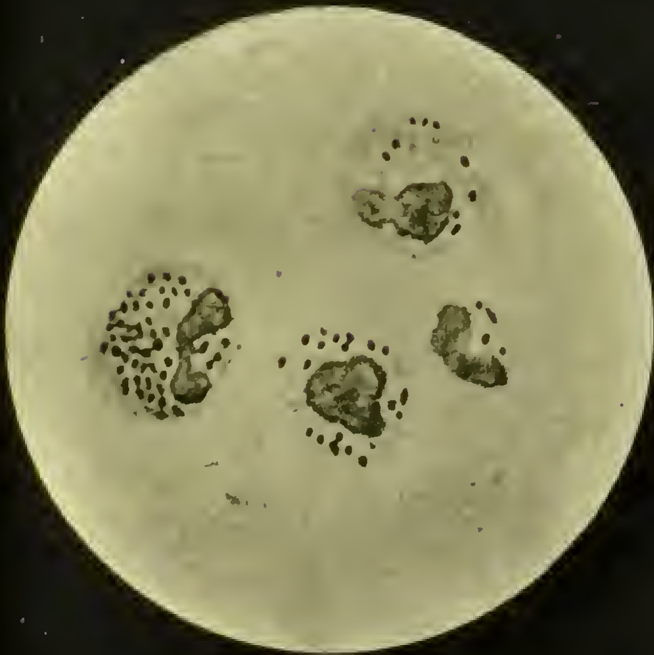
2.



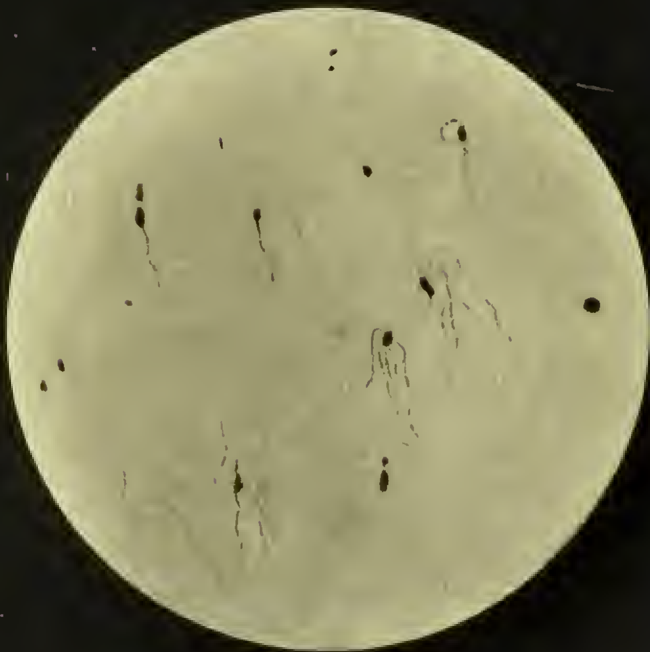
3.



4.

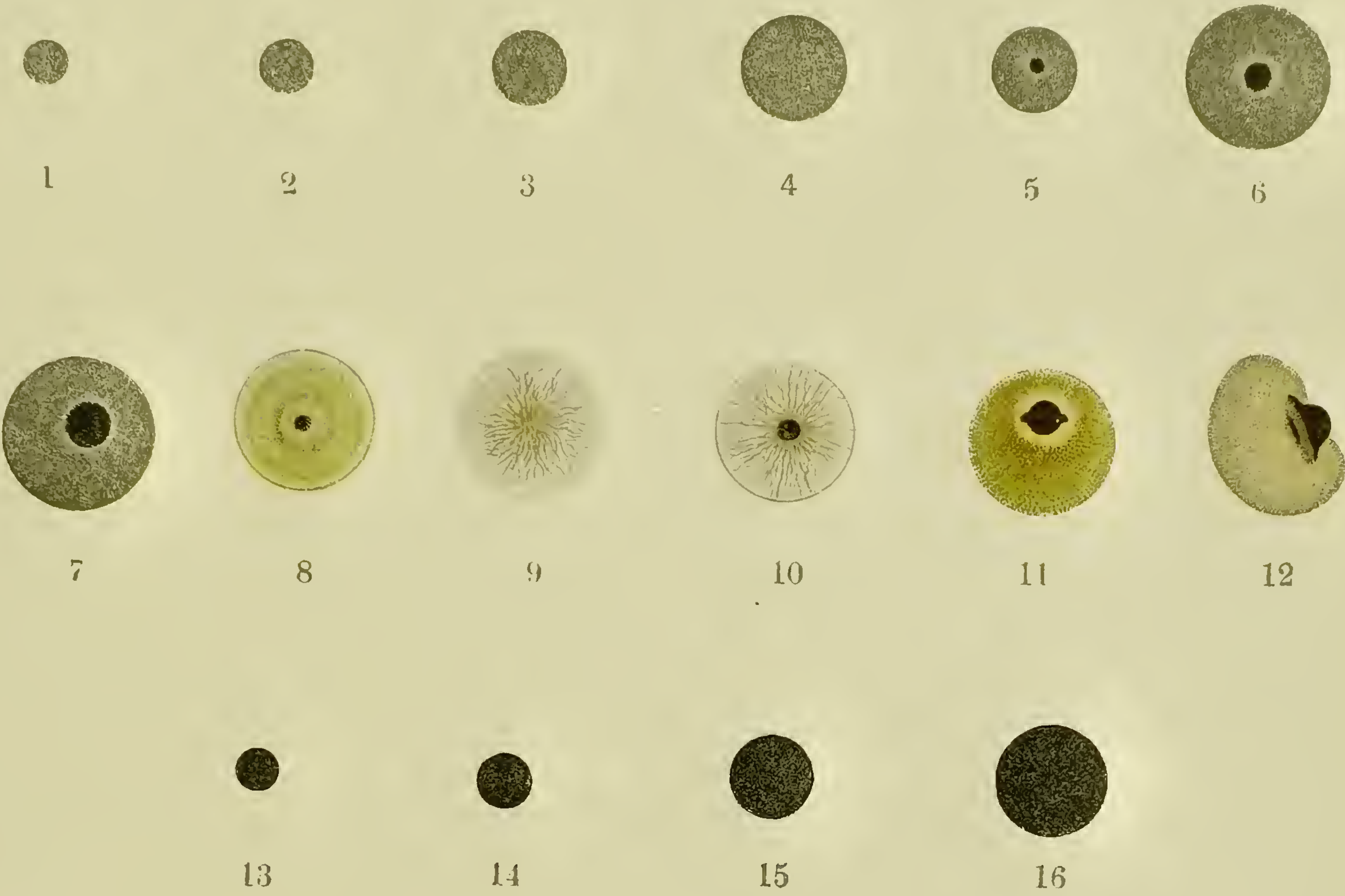


5.

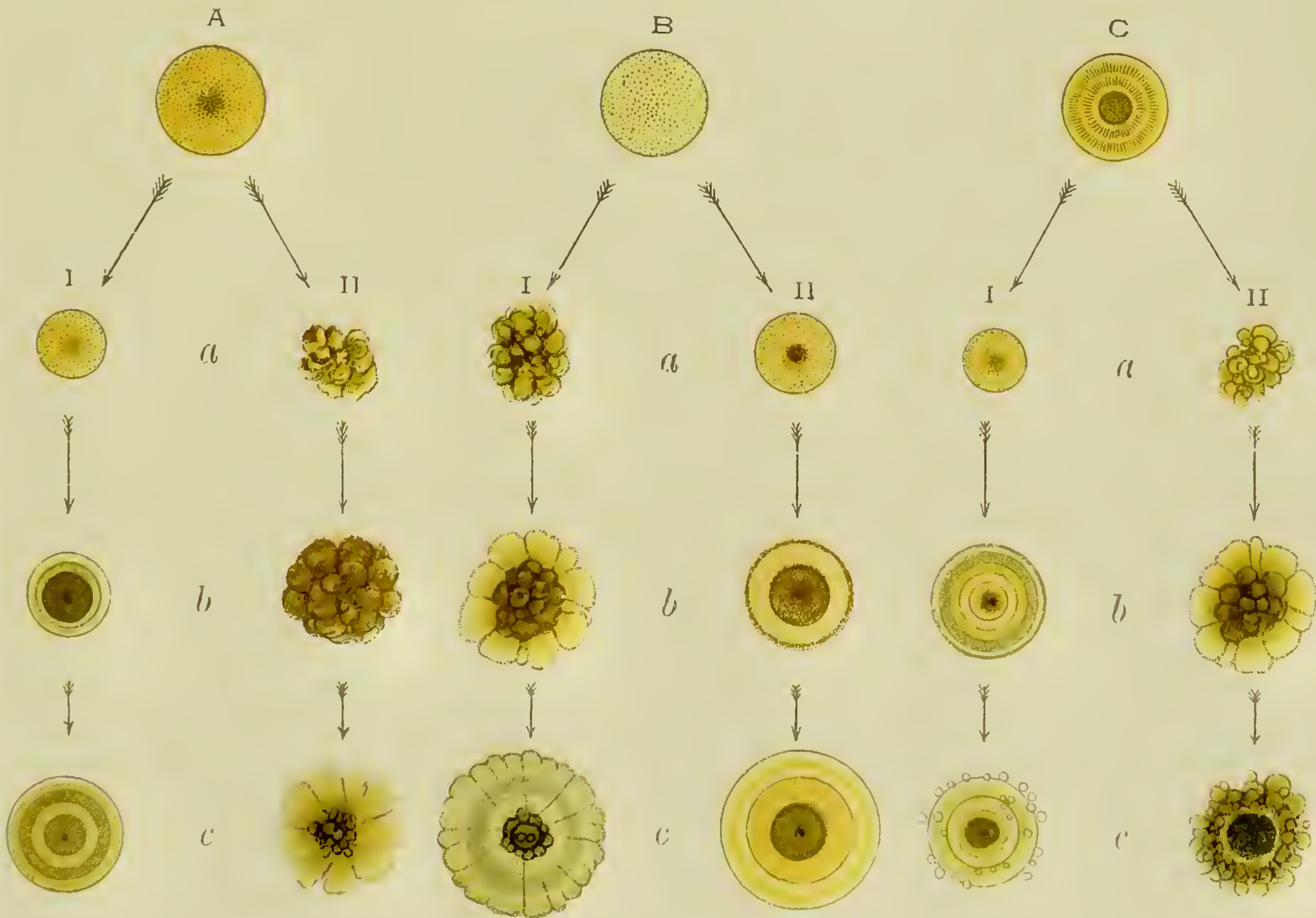


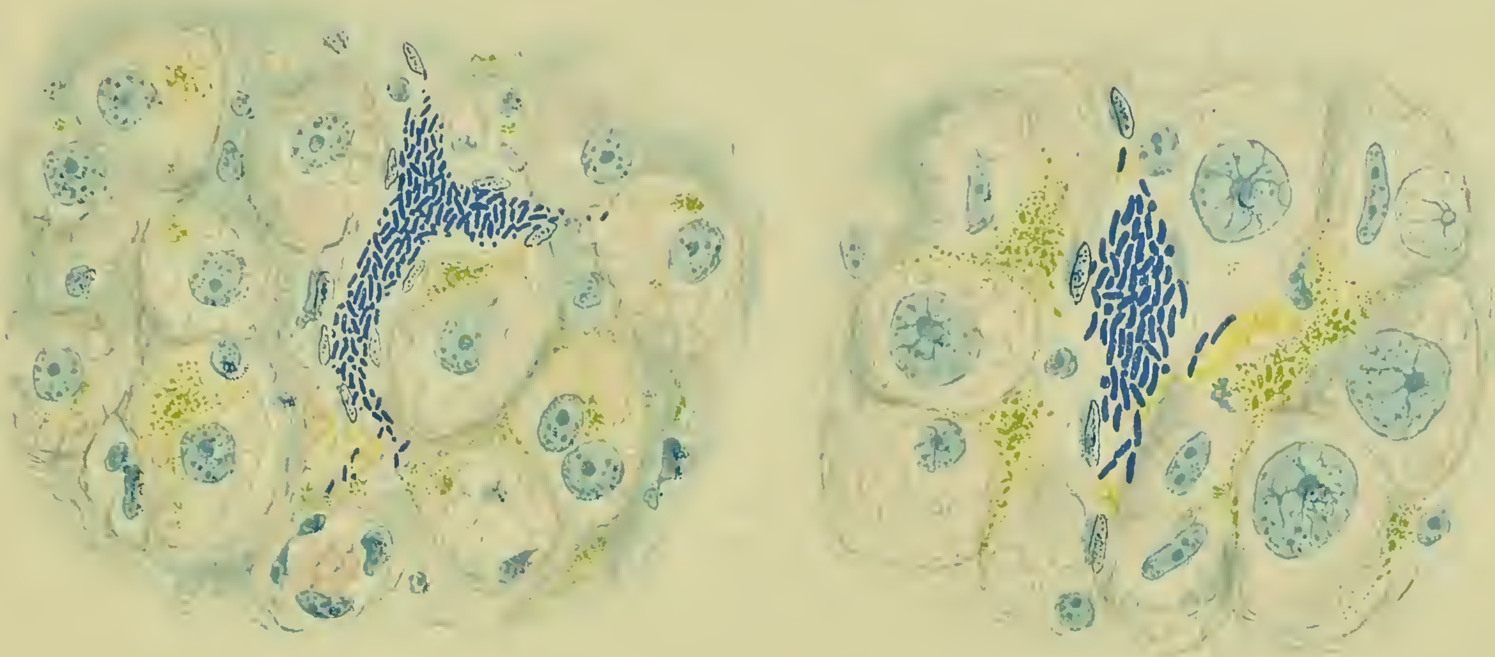
6.

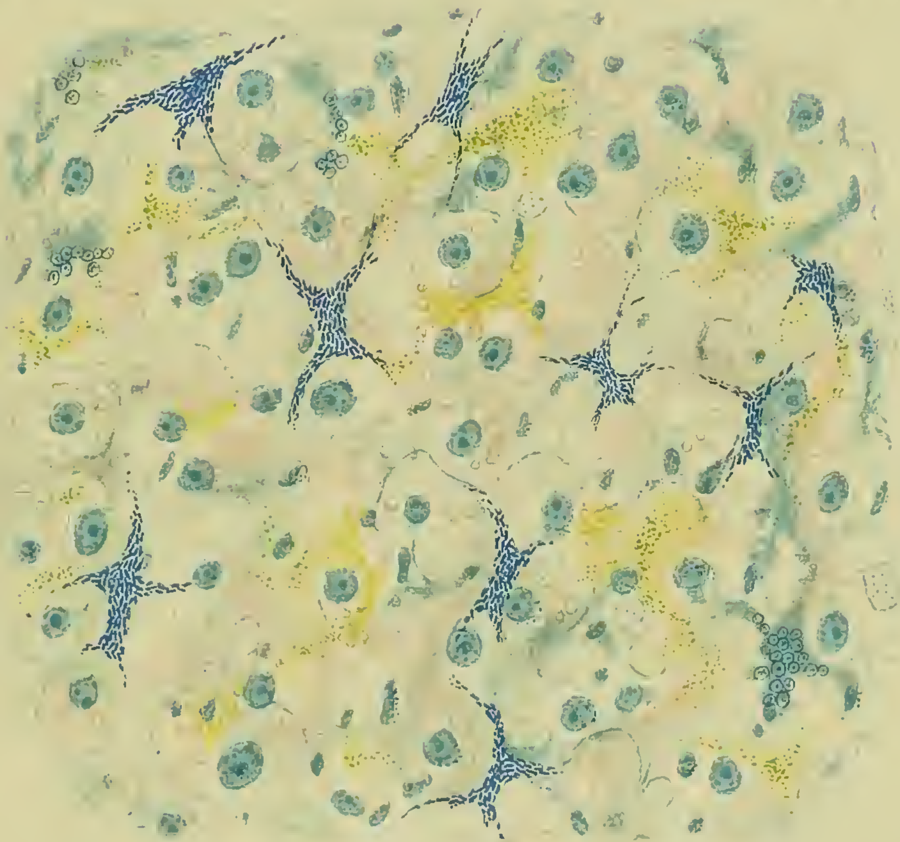
BACILLUS ICTEROÏDES

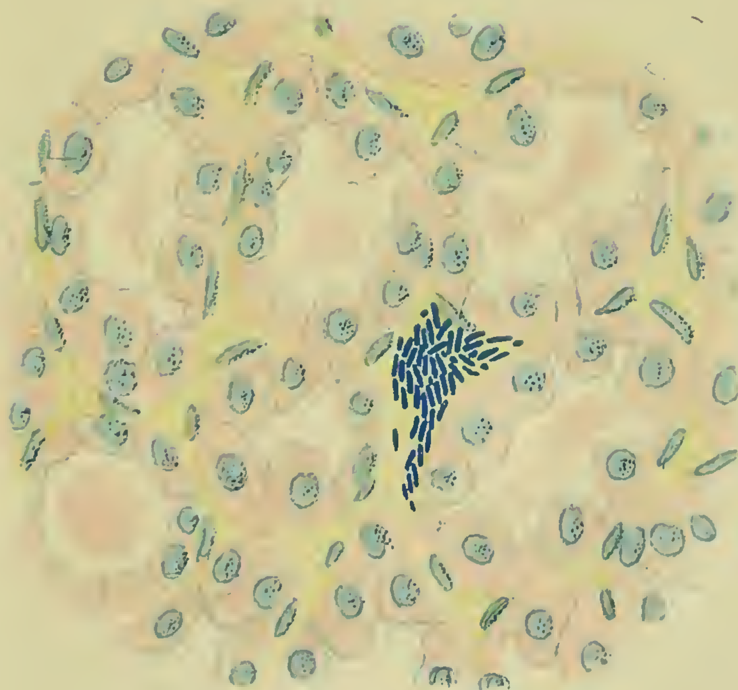


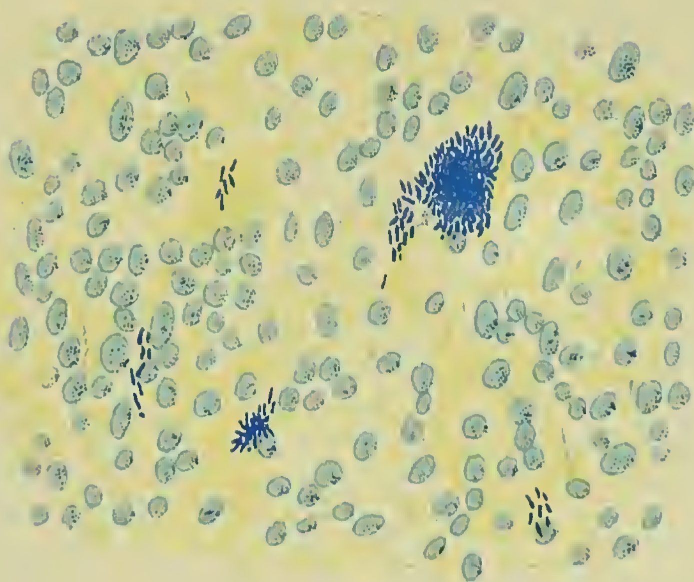
BACILLUS COLI COMMUNIS

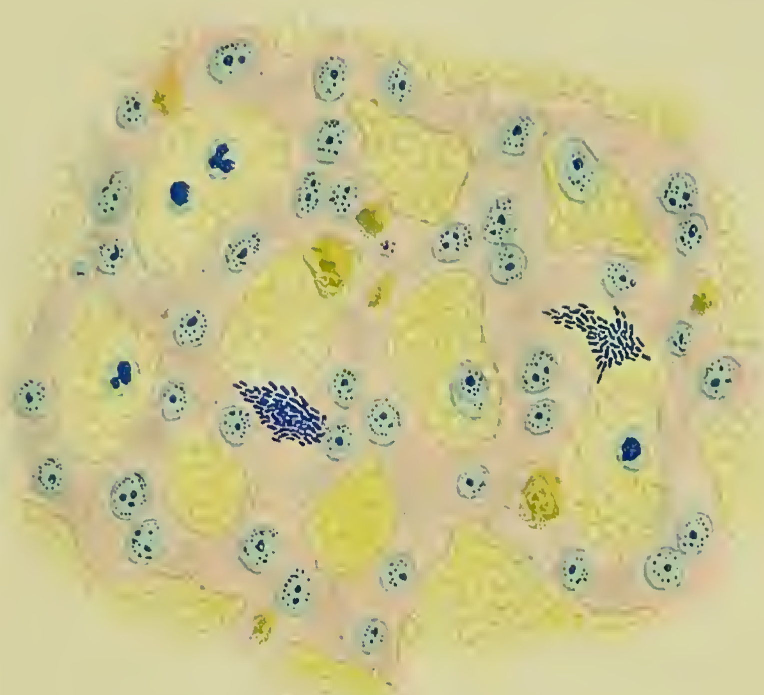


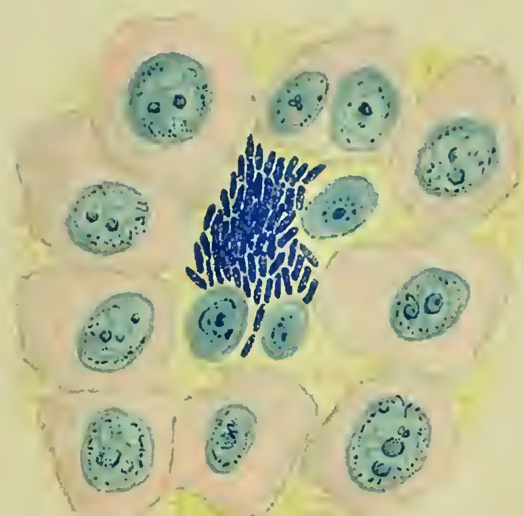


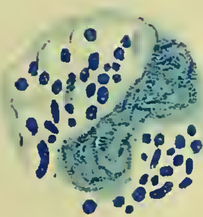




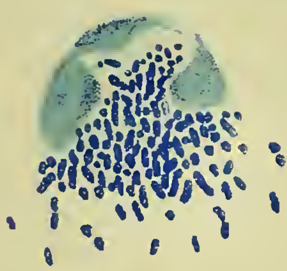


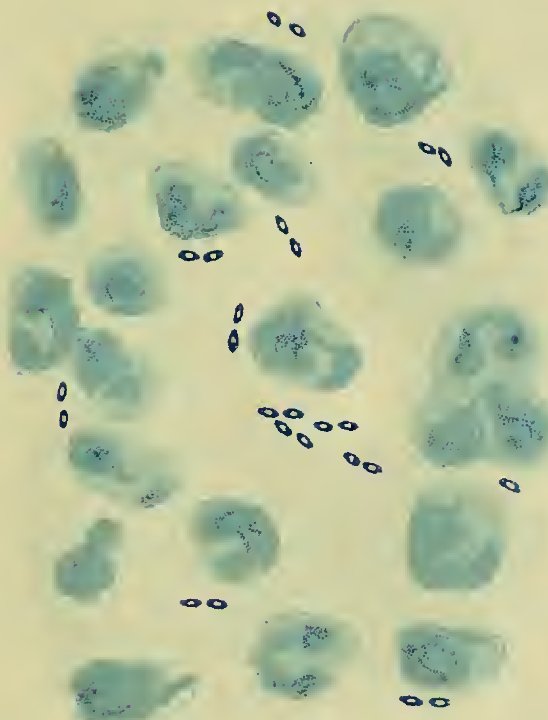




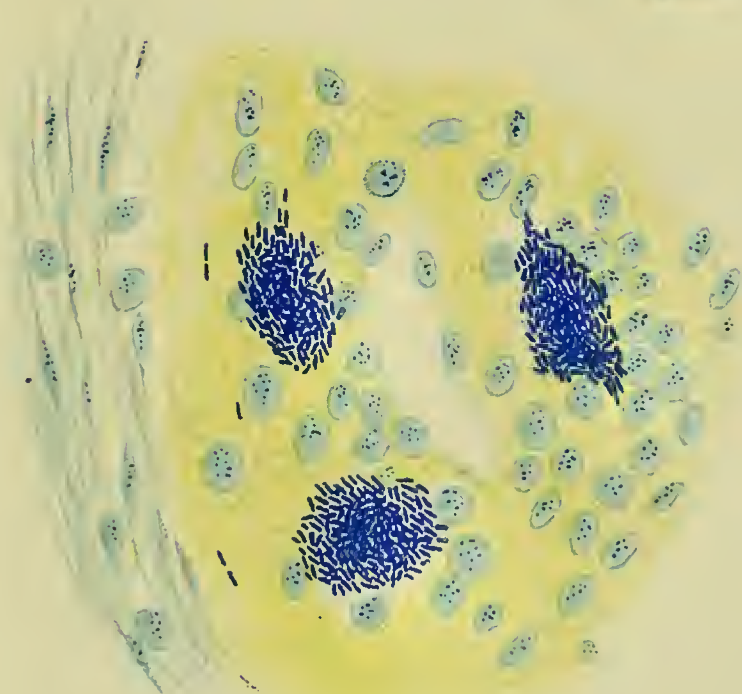












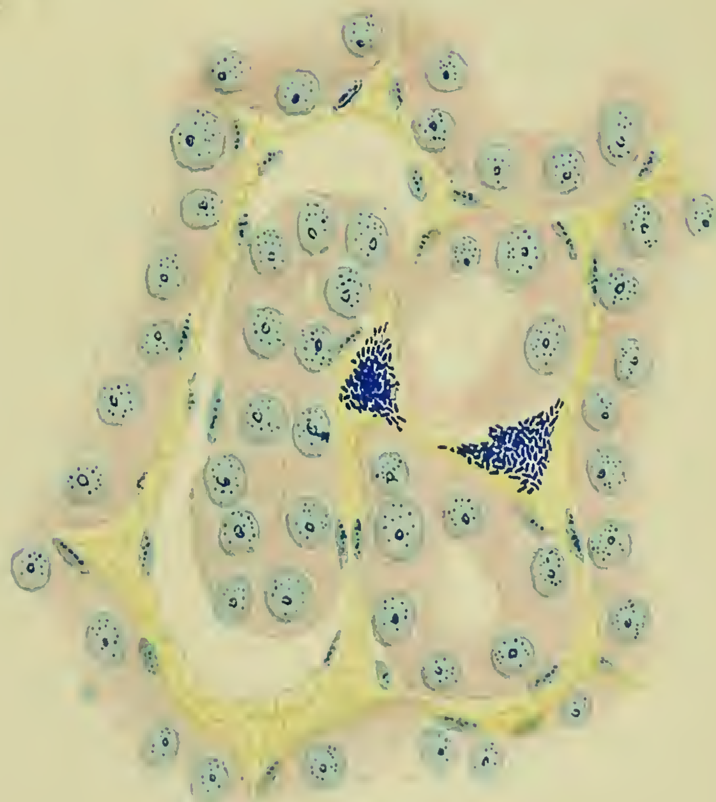




Fig. 1

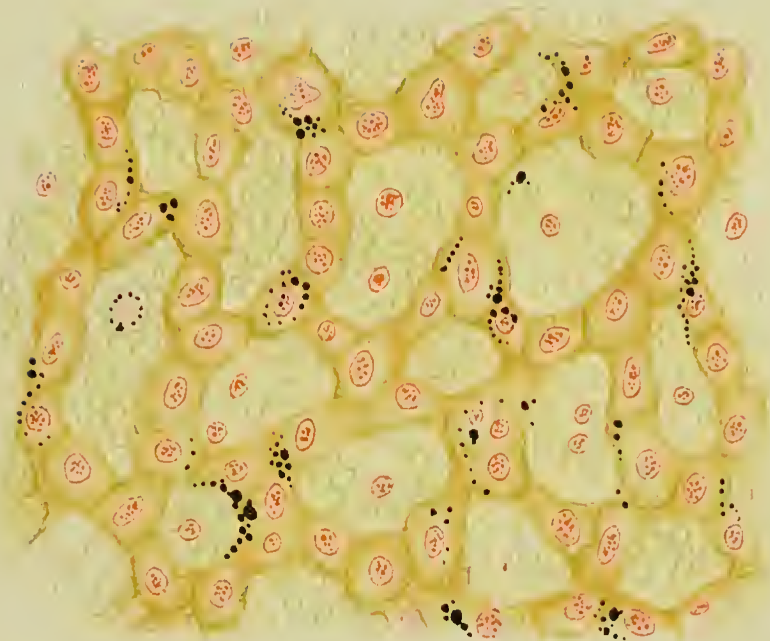


Fig. 2

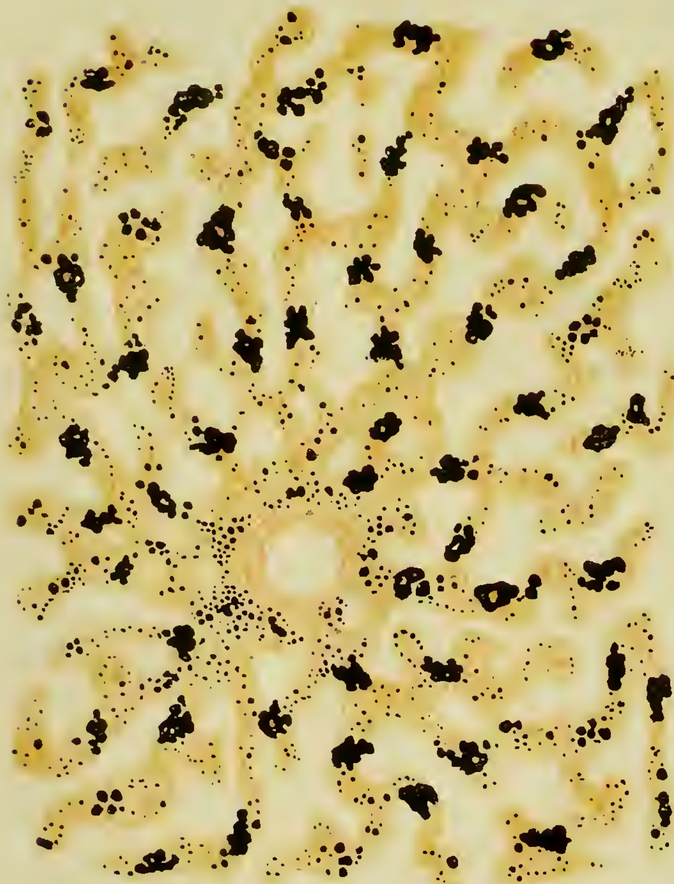


Fig. 3

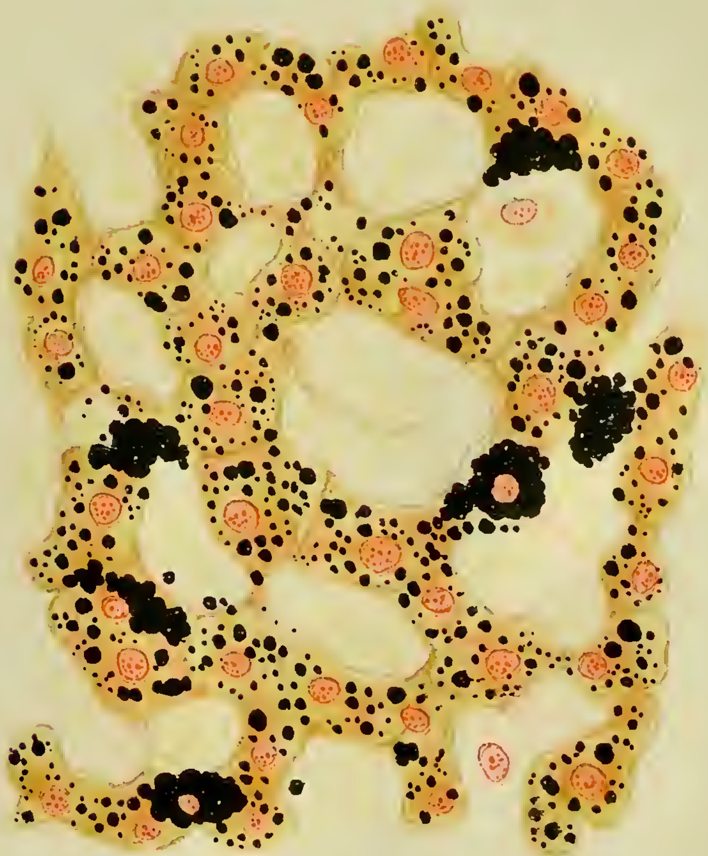


Fig. 4

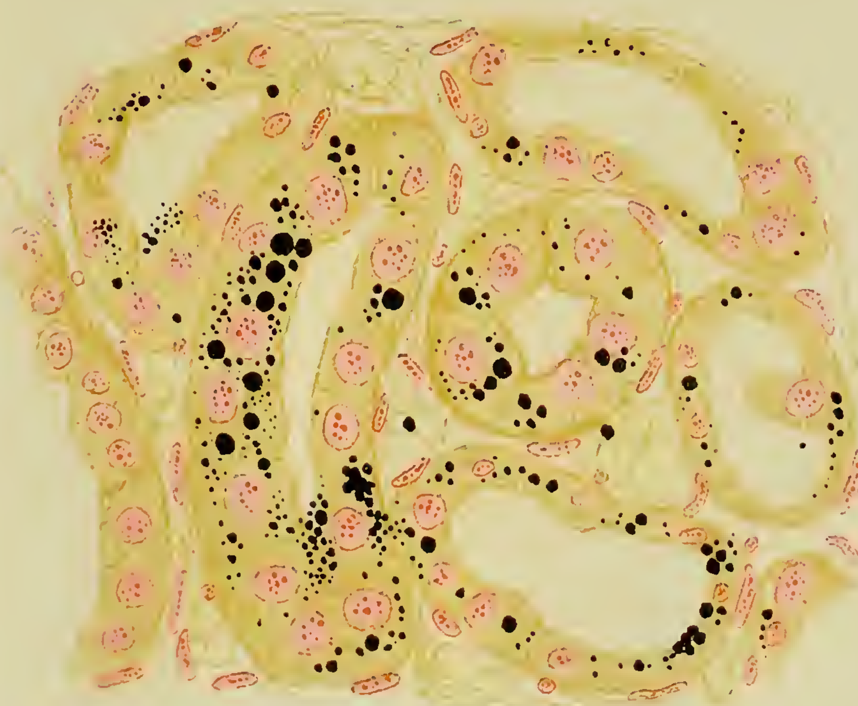


Fig. 5

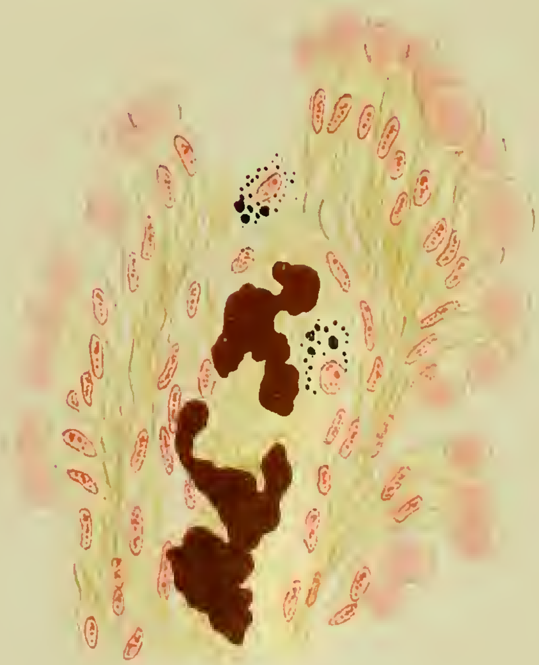


Fig. 6

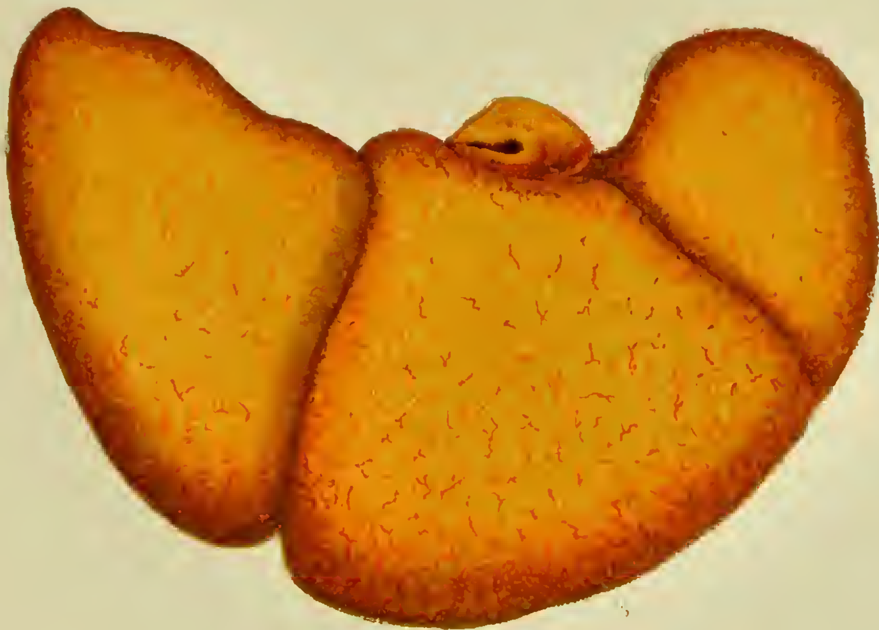


Fig. 1



Fig. 3



Fig. 2

PARTE SECONDA.

I.

Il veleno amarilligeno.

I sintomi, le lesioni e i reperti bacteriologici della febbre gialla, così nell'uomo come negli animali, fanno presumere la esistenza di un veleno specifico prodotto dal *bacillo icteroide* e capace di svolgere di per sè solo, tutto il quadro morboso che abbiamo descritto comparativamente sinora.

Oltre a ciò lo scarso numero in cui si ritrova d'ordinario il *bacillo icteroide* nell'organismo umano, e la violenza dei sintomi che si provocano immediatamente nei cani, in seguito alla iniezione endevenosa di culture relativamente poco abbondanti, fanno supporre che il veleno amarilligeno debba essere un corpo molto energico, e perciò attivo anche a piccole dosi.

Era quindi interessante studiarne l'azione nell'organismo animale.

In queste ricerche mi sono servito sempre di culture di 15-20 giorni, semplicemente filtrate attraverso la candela CHAMBERLAND.

Riguardo al mezzo di cultura, dirò subito che dopo molteplici tentativi effettuati con svariatissime mescolanze nutritive, ho finito con l'adottare il comune brodo di carne peptonizzato.

La toxina preparata in una maniera così semplice, venne quindi saggiata nelle cavie, nei conigli, nei cani, nelle capre, negli asini, nei cavalli e nell'uomo.

II.

L'intossicazione amarilla nelle cavie e nei conigli.

Questi animali non son molto adattati allo studio della toxina amarilligena. I resultati che si ottengono in seguito alle iniezioni sottocutanee od intravenose delle culture filtrate sono poco concludenti.

Le *cavie* muoiono in 24 ore solamente, se si iniettano loro dosi assai elevate 15-20 cmc. Le dosi minori di 2-5-10 cmc. non fanno altro che determinare una diminuzione progressiva del peso del corpo, che si accentua durante 10-12 giorni, dopo i quali, in generale, gli animali si ristabiliscono ritornando al peso primitivo.

Ho voluto studiare anche l'effetto del riscaldamento su queste culture filtrate, ed ho riscontrato che la temperatura di 70° c, non ne altera quasi affatto il potere tossico, mentrel a temperatura di 100° c. lo attenua sensibilmente.

Se invece di impiegare le culture filtrate s'impiegano le culture sterilizzate all'etere, in tal caso il potere tossico è molto più elevato. Anche la piccola dose di 1 cmc. iniettata sotto la cute, è capace di far diminuire in 24 ore il peso del corpo di una cavia di 300 grammi, dai 15 ai 20 grammi.

Però anche in questo caso le piccole dosi non fanno che diminuire transitoriamente il peso del corpo. Per uccidere le cavie di 300 grammi occorrono per lo meno 10 cmc. iniettati in una sola volta: la morte avviene allora dopo 10-20 o 30 giorni

Le lesioni riscontrate all'autopsia, tanto dopo una intossicazione acuta, come dopo una intossicazione cronica, non presentano nulla di interessante. Nei casi acuti si hanno fenomeni congestivi generali, nei casi cronici si ha il reperto della cachessia.

Nei *conigli* si osserva una resistenza alquanto minore.

La via più conveniente pcr produrre la intossicazione è quella endovenosa. Le dosi di 2-6 cmc, di cultura filtrata, rimangono senza effetto; ma a cominciare da 10 cmc. i conigli di 1 kg. muoiono

regolarmente in 7-8 giorni, senza presentare però alcun fenomeno che possa interessare l'indole delle nostre ricerche.

Ho quindi abbandonato ben presto i piccoli roditori, ritenendoli poco adatti a questo genere di ricerche.

III.

L'intossicazione amarilla nei cani.

In questi animali si riproducono con la toxina i medesimi sintomi e le medesime lesioni che abbiamo descritte a proposito delle esperienze fatte col virus.

Anche qui si ripete però il medesimo inconveniente che abbiamo già segnalato riguardo al virus: vale a dire che la quantità di toxina capace di fare ammalare o di uccidere un cane è oltremodo variabile. Essa è tuttavia sempre ragguardevole ed i suoi effetti sono diversi a seconda che si inietta sotto la cute o direttamente nelle vene.

L'iniezione sottocutanea è sempre da sconsigliarsi. Essa produce, anche a dosi moderate di 5-10 cmc. delle enormi tumefazioni locali, di lentissimo riassorbimento ed è affatto incapace, anche in grandi quantità, di determinare la manifestazione dei sintomi caratteristici della febbre gialla nel cane.

È molto probabile che la toxina amarilligena determini nel punto di innesto un processo infiammatorio o necrotico oltremodo rapido, il quale impedisca od ostacoli molto la sua diffusione nell'organismo. Infatti noi verificheremo il medesimo fenomeno anche in altri animali e persino nell'uomo medesimo.

Se invece delle culture semplicemente filtrate, si inoculano sotto la cute delle culture sterilizzate con etere, i fenomeni locali sono anche più gravi ed accentuati, ma, all'infuori della febbre che può durare qualche giorno, e di un malessere, facilmente spiegabile per l'imponente tumefazione e per il forte dolore locale che generalmente l'accompagna, non si osservano mai fenomeni generali importanti.

Parrebbe che la toxina inoculata sotto la cute, fosse quasi neutralizzata, digerita ed annientata dalla enorme quantità di leucociti che si raccolgono immediatamente attorno al punto di inoculazione

e che bene spesso finiscono col determinare delle grosse raccolte purulente, le quali col tempo si ulcerano e si svuotano all'esterno.

Nemmeno ripetendo per vari giorni di seguito le inoculazioni sottocutanee di forti dosi, è giammai possibile provocare il vomito, la gastro enterite, la fotofobia etc., che si riproducono con tanta facilità mercè le iniezioni endovenose del virus e che vedremo potersi riprodurre altresì mediante le iniezioni endovenose delle toxine.

Ciò che può osservarsi alla lunga nei cani che hanno ricevuto durante molto tempo la toxina per via sottocutanea, si è una diminuzione del peso del corpo, una corizza ostinata, accompagnata da abbondante catarro della mucosa nasale, ed una tumefazione diffusa e dolorosa di tutto il tessuto sottocutaneo all'intorno della sede delle iniezioni.

Siccome però tutto questo non presenta nulla di interessante, così nello studio delle toxine ho abbandonato l'iniezione sottocutanea, per attenermi esclusivamente alle iniezioni endovenose.

Queste ultime possono eseguirsi facilmente in una qualunque delle numerose vene superficiali che si osservano alla faccia interna delle coscie.

La dose di cultura filtrata da iniettarsi, onde ottenere risultati dimostrativi, varia naturalmente a seconda di molteplici fattori che si ripetono in tutte le esperienze eseguite sui cani. Però la dose di 24-40 cmc. nei cani di circa 3-4 kg.; è sufficiente per provocare immediatamente dei fenomeni gravissimi.

Infatti, subito dopo l'iniezione, l'animale non presenta nulla di particolare, ma trascorsi 10-15 minuti gli si manifesta un brivido generale che lo scuote senza interruzione, compaiono quasi sempre delle scariche diarroiche, comincia un'abbondante secrezione lacrimale ed entra infine in iscena il vomito impetuoso e continuo, dapprima alimentare e poscia mucoso, di modo che in poco tempo l'animale svuota completamente tutta la sua cavità gastrica e si distende nella gabbia affatto privo di forze.

Spesso si verifica precoce ematuria.

Se la dose fu moderata, il cane si ristabilisce prontamente dal violento attacco, paragonabile ad un avvelenamento prodotto da un energico vomitivo, ma se la quantità di toxina è assai grande (150-200 cmc.), o si ripete nei giorni successivi, aumentandola a dosi sempre più elevate, il cane finisce per soccombere, presen-

tando le medesime lesioni anatomiche che abbiamo descritte, come dovute all'azione del virus vivente.

Queste lesioni per lo più sono le seguenti: *torace* con essudazione sierosa talora abbondante (60-100 cmc.), costituita per lo più da un liquido trasparente, di color rosso vino (emoglobinico); degenerazione grassa del miocardio; *addome: fegato* asciutto, con larghe macchie color giallognolo, che l'esame microscopico dimostra costituite da cellule epatiche completamente degenerate in grasso, e da innumerevoli gocce di grasso affatto libere; la *milza* è di aspetto normale; i *reni* presentano i segni della nefrite parenchimatosa acuta; la *vescica urinaria* è contratta e contiene poche goccie di urina albuminosa o ematurica. La *mucosa gastrica* ha un colorito brunastro ed il suo contenuto, come quello del canale intestinale, è rappresentato da un liquido color caffè. Il reperto che presenta infine un interesse tutto particolare è quello bacteriologico.

Quasi mai il sangue ed i visceri dei cani che muoiono di intossicazione amarilla, soprattutto se essa ebbe una durata di alcuni giorni, si mostrano sterili. Il più delle volte si ottengono culture abbondantissime di *streptococchi*, più raramente di *colibacilli* o di *stafilococco aureo.* Si verifica infine una completa analogia con ciò che abbiamo segnalato nell'uomo. L'amarillismo facilita cioè regolarmente l'entrata in iscena delle infezioni secondarie.

In un prossimo paragrafo ci occuperemo anche del meccanismo di queste infezioni secondarie, che presentano tanto interesse, sia dal punto di vista clinico, come da quello bacteriologico.

IV.

La intossicazione amarilla nel gatto, nella capra, nell'asino e nel cavallo.

Il *gatto* è molto resistente tanto all'azione del virus come a quella della toxina icteroide. Gli si possono iniettare delle dosi veramente formidabili, tanto dell'uno come dell'altra, senza ottenere altre conseguenze che una diminuzione del peso, più o meno accentuata, seguita da processi infiammatorii nel punto d'innesto. Quest'animale deve considerarsi quindi come il più resistente di quanti ho avuto

occasione di sperimentare sin'ora e perciò, dal punto di vista della patogenia della febbre gialla sperimentale, il suo studio non presenta alcuna utilità immediata.

Riguardo alla *capra*, come anche all'*asino* ed al *cavallo*, le mie ricerche non sono state condotte con una maniera sistematica, trattandosi di animali di grossa taglia e di un valore commerciale relativamente elevato, ma ho potuto ugualmente studiare in essi l'azione del veleno amarilligeno durante i molteplici tentativi di vaccinazione che vado praticando da vario tempo e che talvolta furono seguiti dalla morte degli animali.

All'opposto del come si comporta rispetto alle ben note infezioni, la *capra*, è molto sensibile al virus come alla toxina amarilligena. Abbiamo già visto più sopra come sieno sufficienti piccole dosi di virus per uccidere una grossa capra adulta. Relativamente alla toxina non è possibile stabilire una misura fissa.

Talvolta ho visto dei piccoli capretti tollerare per molti giorni di seguito delle dosi assai grandi (15-20 cmc.) di toxina, senza dimostrare altro che un dimagramento passeggero, mentre mi sono morte delle capre adulte ed in eccellente stato di salute, dopo la iniezione sottocutanea di piccole dosi frazionate.

Ecco qui per esempio il risultato interessante di una di queste intossicazioni nelle capre, seguita da morte, che riporto dal mio protocollo delle vaccinazioni.

Capra adulta n. 2, Kg. 20.

Il 2 ed il 5 di agosto venne inoculata sotto la cute con 1 cmc. di cultura filtrata. Localmente presentò lieve tumefazione con evidente dolorabilità della parte; l'8 agosto ricevette altri 2 cmc.; l'11 detto 3 cmc.; il 13 ed il 17 altri 5 cmc.; infine il 19 ed il 21 detto 10 cmc.

Perciò in 18 giorni aveva ricevuto complessivamente 37 cmc. di cultura filtrata. Ma il giorno stesso della ultima iniezione si ammalò e morì durante la notte. I risultati dell'autopsia furono i seguenti:

Torace: presenza di 500 cmc. di essudato sieroso, trasparente, privo di leucociti, color rosso vino, in entrambi le cavità pleuriche. Analizzato chimicamente quest'essudato dimostrò un contenuto di urea uguale al 2.70 $^0/_{00}$, vale a dire uguale alla quantità che si trova nel sangue degli animali nefrotomizzati. Studiato dal punto di vista biologico, aggiungendolo nella proporzione di 1:25 ad una brodo-cultura fresca di *bac. icteroide*, produsse in 1 ora e 30' l'immobilizzazione e l'agglutinamento di tutti i microbi.

Il *fegato* presentava macroscopicamente l'aspetto della noce moscata; i preparati eseguiti per dilacerazione nell'acido osmico, dimostrarono una com-

pleta degenerazione grassa di tutte le cellule epatiche. Le lesioni dell' organo fissato in liquido di Flemming sono identiche a quelle disegnate in una delle tavole che accompagnano la presente memoria. La *milza* era di volume normale, ma meno compatta e resistente che d'ordinario. I *reni* trovavansi in preda ad un processo infiammatorio talmente intenso, che alla superficie di taglio non si distingueva più la parte corticale da quella midollare, ma presentava un colore feccia di vino; i preparati a fresco in acido osmico rivelarono pure nel rene la presenza di una certa quantità di gocce di grasso. Le sezioni eseguite da pezzi fissati in liquido di Flemming rivelano come lesione fondamentale e molto diffusa una necrosi dell'epitelio dei canalicoli urinari, per cui quest'ultimo trovasi torbido, granuloso, in forma di zolle e in grandissima parte privo di nuclei o con nuclei incapaci di colorarsi. La *vescica urinaria*, completamente retratta, presentava moltissime macchie ecchimotiche, conteneva circa 10 cmc. di un liquido color rosso sangue. L'esame microscopico dimostrò l' assenza completa di globuli rossi, ma l' esame all' emometro di Fleischl dette un contenuto di emoglobina uguale al 30 $^0/_0$.

Gli intestini trovavansi in gran parte congesti, iperemici ed ecchimotici.

Il peso del cadavere era di Kg. 15.370; la diminuzione verificatasi in soli 18 giorni era stata perciò di Kg. 4.630. Il reperto bacteriologico fu negativo.

Riassumendo quindi: possiamo ritenere che anche nella capra la toxina icteroide riproduce esattamente, ad eccezione del vomito, le stesse lesioni che abbiamo già segnalate nei cani e nell'uomo.

Sono sopratutto notevoli nella capra la grande tendenza alla ematolisi (essudati emoglobinici, emoglobinuria) e la estrema sensibilità del rene alla toxina amarilligena. La morte dell'animale devesi quindi in gran parte alla profonda lesione di questo viscere, giacchè la notevole quantità di urea che si riscontra negli umori dell'organismo rappresenta già un importante elemento presuntivo in favore di una grave intossicazione uremica.

Le mie esperienze sull'*asino* si limitano ad una sola.

Si trattava di una robusta asina creola, solita a fornire giornalmente grandi quantità di latte.

Il 26 dicembre si inoculò sotto la cute con 5 cmc. di toxina filtrata. Al giorno seguente comparve nel punto d'innesto una estesa tumefezione dolorosa. Dopo due giorni, dai cappezzoli delle turgide mammelle cominciarono a colare alcune goccie di sangue e l'animale apparve triste, abbattuto e disappetente.

Frattanto la temperatura rettale da 38°,2′ — 38°6, era salita sino a 41°. Il 2 gennaio, essendo tornata normale la temperatura, fu inoculata di nuovo con 10 cmc. di toxina. Si rinnovò la tumefazione nel punto d'innesto ed il latte cominciò a scomparire dalle mammelle. Il 5 detto, nuova inoculazione di 15 cmc. di cultura filtrata, ed il giorno 8 nuova iniezione sottocutanea di

5 cmc. di cultura in brodo sterilizzata con etere. La scomparsa del latte divenne allora completa e le tumefazioni localizzate nei punti d'innesto si manifestarono con relativa intensità.

Il 12 gennaio a ore 3 pom., avendo ricevuto quindi complessivamente soli 30 cmc. di cultura filtrata e 5 cmc. di cultura sterilizzata con etere, fu inoculata per via intravenosa con 10 cmc. di cultura in brodo pure sterilizzata con etere. Subito dopo l'iniezione l'animale provò della dispnea da cui si ristabilì ben presto, ma durante la notte partorì un piccolo embrione lungo circa 8 cm. e sul far del giorno morì.

I risultati dell'autopsia eseguita al mattino di buon ora, furono i seguenti: *Torace:* essudato siero-emorragico in entrambi le cavità pleuriche; *addome: fegato* un po' degenerato in grasso: l'esame microscopico a fresco con acido osmico rivela le cellule epatiche piene di piccole granulazioni grasse; la *milza* è di volume normale, ma flaccida e spappolabile; i *reni* presentano i segni della nefrite acuta diffusa, gravissima; la *vescica urinaria* è retratta e contiene poca quantità di urina, di color rosso ed in cui l'esame microscopico dimostra la presenza di enorme quantità di leucociti, globuli rossi ed epiteli; il riscaldamento ne determina la coagulazione *in blocco*, come se si trattasse di albumina pura. La cavità peritoneale contiene un'abbondante quantità di siero limpido, ma colorato in rosso. La mucosa dello stomaco e degli intestini in alcuni punti presentasi notevolmente congesta.

L'analisi chimica del sangue vi rivelò l'1,29 $^{0}/_{00}$ di urea.

Il reperto bacteriologico fu il seguente: il sangue, la milza ed i reni risultarono sterili, ma il fegato conteneva una discreta quantità di *colibacilli* e di *stafilococco aureo* e la urina presentava una quantità assai grande di *stafilococco albo ed aureo*, misti ad altre tre specie microbiche indeterminate.

Rinnovasi perciò anche nell'asino, con ben poche varianti, lo stesso meccanismo patogenico di sempre: processi infiammatori e degenerativi nel fegato e nei reni, lesioni delle mucose, fenomeni emorragipari nei parenchimi, nelle cavità sierose, nelle mucose, in organi ghiandolari (mammelle), ed in ultimo il quadro finale dominato dalla intossicazione uremica e dalla invasione di microbi nell'organismo.

Veniamo infine a parlare degli effetti della toxina nei *cavalli.*

Intorno a tale argomento saremo assai brevi, perchè essendo questi animali destinati alla produzione di un siero specifico, tratteremo particolarmente in altra occasione gli effetti su essi prodotti dalle inoculazioni di *toxina icteroide.*

Il cavallo è straordinariamente sensibile anche alla iniezione di piccole quantità di toxina. Può dirsi quindi in tesi generale che quanto più ascendiamo nella scala zoologica, tanto più sviluppata si presenta la sensibilità degli animali verso questo potente e strano veleno.

La iniezione sottocutanea anche di piccole dosi di culture filtrate (5-10 cmc.), determina sempre una forte tumefazione locale, seguita da febbre, che dura 12-24 ore.

Questa tumefazione è oltremodo dolorosa e lenta a scomparire.

Allorquando l'iniezione è più abbondante ed invece di iniettare culture filtrate si iniettano culture sterilizzate con etere, che sono molto più attive, la tumefazione che si produce diviene voluminosa ed è seguita costantemente dalla comparsa di vasti edemi sottocutanei, che si estendono nelle parti declivi del ventre, raggiungono gli arti e finiscono talvolta con disturbare durante vari giorni i movimenti delle articolazioni.

Quasi sempre si determinano poi alla superficie della cute abnormemente distesa, delle ulcerazioni sanguinolente che suppurano e sono di difficile guarigione. Tanto gli ederni come le tumefazioni che si producono nel luogo stesso della iniezione, non iscompaiono che dopo molti giorni, durante i quali gli animali presentano bene spesso una febbre quasi continua.

Le iniezioni endovenose sono tollerate molto più facilmente, ma hanno gravi inconvenienti.

Dopo ogni iniezione l'animale presenta regolarmente un forte accesso di dispnea e cade in preda ad un tremore generale che lo obbliga a gittarsi al suolo. Compare la febbre e per alcune ore l'animale rimane alquanto abbattuto. Però al giorno seguente la temperatura ritorna allo stato normale e non si ha da lamentare, di solito, nessun'altro incidente.

Nel corso delle mie esperienze ho dovuto tuttavia lamentare la morte di qualche cavallo, uno dei quali appartenente alla razza creola, che è molto meno resistente di quella meticcia alla toxine in generale e sopratutto a quella difterica ed amarilligena.

L'autopsia molto sommaria di questo cavallo creolo, che poco avanti la morte aveva avuto alcune scarse enterorragie. dette per risultato una forte tumefazione della milza, una degenerazione del fegato, nefrite, albuminuria ed alcuni focolai di enterite.

Questo è quanto ho potuto osservare riguardo agli effetti del veleno icteroide negli animali.

Non ho creduto necessario insistere oltre su queste ricerche,

che ho voluto anzi esporre in maniera molto sommaria, primieramente perchè non dànno altro che la riproduzione più o meno attenuata delle medesime lesioni che abbiamo già studiate col virus; in secondo luogo perchè ho stimato più conveniente risolvere di una maniera perentoria e definitiva le funzioni specifiche della toxina amarilligena, sperimentandola direttamente sulla razza umana.

V.

La febbre gialla sperimentale nell'uomo, riprodotta con la toxina amarilligena.

Le mie esperienze sull'uomo ascendono al numero di cinque.

Per ragioni facili a comprendersi, non ho impiegato culture viventi, ma semplicemente culture in brodo di 15-20 giorni, filtrate per la candela Chamberland e quindi, per maggiore precauzione, sterilizzate con qualche goccia di aldeide formica.

In *due* individui ho sperimentato l'effetto delle iniezioni sottocutanee, in altri *tre* l'effetto delle iniezioni endovenose.

Riassumo brevemente dal mio protocollo di note.

Iniezioni sottocutanee.

Osservazione I.

A. T. di anni 36, spagnuolo; peso kg. 63.

8 ottobre, ore 4 pom. Iniezione sottocutanea, in corrispondenza del bicipite brachiale, di 2 cmc. di cultura filtrata e sterilizzata.

Al giorno successivo si osserva nel punto inoculato una larga zona circolare, fortemente arrossata, tumefatta, ma poco dolorosa, per l'estensione di circa 10 centim. di diametro. Le condizioni generali sono tuttavia buone. La reazione febbrile ha raggiunto per due giorni consecutivi 38°3′ C.

A cominciare dal 6° giorno la tumefazione tende a scomparire ed il giorno 20 dello stesso mese, cioè dopo 12 giorni, il braccio ritorna di aspetto normale.

Osservazione II.

E. B. di anni 30, italiano; peso kg. 53.250.

19 ottobre, ore 3,30 pom. Iniezione sottocutanea (in corrispondenza del bicipite brachiale destro) di 3 cmc. di cultura filtrata e sterilizzata.

20 id. In corrispondenza della iniezione, il braccio apparisce molto arrossato, tumefatto e doloroso. Il paziente è abbattuto, non ha appetito e presenta febbre a 38°,2′-38°.6′ durante tutto il giorno.

L'esame delle urine rivela tracce di albumina.

21 id. La tumefazione si estende voluminosa a tutto il braccio ed alla piega del cubito; la cute è iniettáta e infiammata. Segue la febbre e l'albuminuria.

22 id. Al mattino il paziente è apiretico, ma sul far della sera si verifica di nuovo un lieve movimento febbrile, accompagnato da prostrazione generale. La tumefazione va estendendosi all'avambraccio; l'urina, in quantità normale, contiene sempre tracce di albumina.

23 id. La febbre è del tutto scomparsa, ma la tumefazione del braccio si estende ancora in basso, oltrepassando l'articolazione del polso ed invadendo parte della mano. Tutto l'arto destro è quindi invaso, specialmente nella sua faccia anteriore: la cute è fortemente arrossata e di aspetto erisipelatoso. Tracce di albumina nelle urine.

24 id. La tumefazione comincia a riassorbirsi rapidamente; la temperatura è normale, ma si trovano ancora tracce di albumina nelle urine.

25 id. La tumefazione si riduce a vista d'occhio; il paziente sta bene, ha riacquistato l'appetito e presenta una temperatura normale. Tracce di albumina nelle urine.

26 id. L'arto inoculato è ritornato quasi del tutto allo stato normale, ma le urine sono sempre alquanto albuminose.

29 id. Pratico una *seconda iniezione* di 5 cmc. di cultura filtrata e sterilizzata, nella medesima regione già precedentemente inoculata.

Alla sera stessa si rinnova la febbre e riappare una lieve tumefazione che rimane però assai limitata e scompare con grande rapidità dopo circa 48 ore.

Nei giorni successivi il paziente non manifestò più alcun fenomeno nè locale nè generale.

Iniezioni endovenose.

Osservazione III.

E. N. di 20 anni, spagnuolo; peso kg. 56.

3 novembre, ore 4 pom. Temperatura ascellare 37°.1′. Iniezione endovenosa (nella vena cefalica del braccio destro) di 10 cmc. di cultura filtrata e sterilizzata con aldeide formica.

Subito dopo ricevuta la iniezione, il paziente si corica, giace tranquillo e beve circa un litro di latte sterilizzato.

Dopo circa 15 minuti manifesta *nausee* e *conati di vomito*, seguiti ben presto da sforzi violenti di *vomiturizione*, che finiscono con l'espellere tutto il latte poc'anzi ingerito.

Contemporaneamente comparisce un'agitazione generale in tutte le membra ed entrano in iscena violenti e continui dolori alla *regione lombare*, che

fanno lamentare fortemente l'infermo e non gli concedono più riposo. A poco a poco anche la *regione addominale* diviene dolorosa. La più lieve pressione della mano esercitata sul ventre o sulla regione lombare esacerba in modo insopportabile tutti questi dolori.

Trattanto la temperatura ascellare sale senza interruzione, e da 37°.1′ che presentava avanti l'iniezione segna 38°.5′ due ore dopo, e tocca 40°3′ alle ore 8 di sera, e cioè dopo 4 ore.

Verso mezzanotte la reazione febbrile cessa ed al mattino torna quasi normale (37°.5′).

Malgrado ciò il paziente sta male e durante tutta la notte non solamente ha dovuto vegliare in preda a dolori angosciosi addominali e lombari, cui si era aggiunta ben presto una *violenta cefalalgia*, ma è stato travagliato continuamente da un *vomito incoercibile*, che dopo avere espulso sino agli ultimi residui alimentari del ventricolo, si è convertito in un *vomito mucoso*, di color verde-giallognolo assai intenso. Comincia a manifestarsi l'*anuria*.

4 novembre. Segue il medesimo stato; si somministra al paziente del latte che viene espulso immediatamente: la *intolleranza gastrica* è completa.

Frattanto l'agitazione generale si accentua sempre più, il paziente avverte un senso indefinibile, angoscioso, che gli toglie ogni calma, ed i *dolori lancinanti alla regione renale* si fanno sempre più persistenti.

Continuando l'anuria accompagnata da *tenesmo spasmodico*, si pratica ripetutamente il cateterismo della vescica, ma non si ottiene neppure una goccia di urina.

I conati di *vomito* non accennano affatto a cessare e la materia vomitata non è altro che della mucosità colorata dalla bile.

Verso sera il tenesmo vescicale comincia a far soffrire immensamente l'infermo, il quale si sforza invano di urinare.

A ore 4 pom. si manifesta un po' di *delirio*, essendo la temperatura ascellare a 38°.5′. Il paziente tenta ripetutamente di gittarsi dal letto e le sofferenze alla regione renale si rendono talmente angosciose, che gli strappano lamentazioni continue. Si cateterizza di nuovo, senza alcun risultato.

Sull'imbrunire l'infermo è assalito da un *sub-delirio* che non lo abbandona per tutta la notte e che è solo interrotto ad ogni istante dagli incessanti sforzi di *vomito*.

5 novembre. — Sul fare del giorno l'ammalato si presenta sfinito, con una *colorazione cianotica* di tutti i tegumenti cutanei.

Il *delirio* si fa ancor vivo e agitato; si verifica qualche *scarica diarroica*, color giallastro, ma persiste completa l'anuria.

La tendenza continua di precipitarsi dal letto, rappresenta la nota dominante di tutto il giorno.

Intanto i *dolori* e l'estrema *iperestesia* delle regioni lombare ed epigastrica si fanno sempre più acuti. Il paziente non può tollerare in presenza di tali regioni neppure il lieve contatto di una mano. A ore 5 ant. la temperatura è a 37°.7′ ma verso le 11 risale 38°.3′ ove rimane per tutto il giorno.

Il vomito è tuttora incessante, quantunque l'infermo, dopo l'iniezione della toxina, non abbia potuto toccar più alcun alimento.

Il liquido vomitato non è più *verde bilioso*, ma presenta un color *caffè* chiaro. Raccolto in un bicchiere a calice, presenta rapidamente un deposito nerastro che esaminato al microscopio appare costituito da globuli rossi del *sangue*, da leucociti, cellule epiteliali della mucosa gastrica e da piccoli coaguli sanguigni. La reazione è acida.

Dopo il mezzodì si pratica di nuovo, ma inutilmente, il cateterismo e non si riesce ad ottenere alcuna goccia di urina.

Il paziente è quindi *anurico* da circa due giorni.

La cute si fa in alcuni punti ancor più congesta ed assume un deciso *color paonazzo*, sopratutto alle braccia ed alla faccia.

Questo color paonazzo è diffuso a guisa di macchie o di strie, laddove la cute è molto sottile (palmo delle mani, faccia interna degli arti inferiori e torace). Compaiono inoltre larghe *macchie giallognole* in vari punti del corpo. Ispezionando le sclerotiche vi si rimarca una *colorazione sub-icterica* assai evidente.

Pratico dalla vena del braccio un *salasso* asettico di circa 25 cmc. di sangue, che lascio coagulare.

Introducendo in vescica una piccola siringa, si riesce ad estrarre, mercè una cannula aspiratrice, qualche goccia di urina torbida, ricca di epitelii e che coagula completamente al calore.

Segue durante tutto il giorno lo stato di delirio, interrotto da brevi pause di stato comatoso.

Pratico con cannule sterilizzate, varie *punture esplorative* nel *fegato* e nei *reni*, aspirando da entrambi i visceri qualche traccia di succo che utilizzo facendo culture ed esami microscopici.

Durante la notte successiva l'ammalato migliora alquanto, e dopo vari giorni finisce col ristabilirsi.

Frattanto io abbandono il seguito, delle osservazioni, per attendere tosto alle:

Ricerche sul sangue.

Le culture praticate in vari mezzi nutritivi rimangono sterili.

La coagulazione si compie regolarmente e pone in libertà circa 10 cmc. di siero limpido e giallognolo. Questo siero aggiunto nella proporzione di 1 : 5 ad una brodo-cultura fresca di bacilli icteroidi, produce in 12 ore la immobilizzazione e l'agglutinamento dei medesimi, che precipitano quasi completamente al fondo del tubo.

L'analisi chimica per la ricerca dell'urea ne rivela il 3,163 $^{0}/_{00}$.

Operando sul coagulo con lo stesso procedimendo (1), evaporando poi il residuo acquoso e riprendendo con acido nitrico, ottengo un'abbondante cristallizzazione del nitrato di urea, che raccolgo e conservo tuttora.

Ricerche sul succo epatico e renale.

Le culture seminate col materiale ottenuto mercè le punture esplorative nel fegato e nei reni, rimangono sterili.

---

(1) Vedi la descrizione del metodo analitico nella parte prima.

L'esame microscopico del succo epatico, eseguito a fresco, impiegando l'acido osmico, dimostra una *profonda degenerazione grassa* di tutte le cellule epatiche: molte gocce di grasso trovansi inoltre nella preparazione, affatto libere. L'esame a fresco del succo renale rivela una intensa tumefazione torbida, con degenerazione granulosa degli epiteli.

Osservazione IV.

N. Q. di 35 anni, spagnuolo; peso kg. 61.

12 novembre, ore 3,30 pom. temperatura ascellare di 37°.3'. Iniezione endovenosa (nella vena cefalica del braccio sinistro) di 5 cmc. di cultura filtrata e sterilizzata con aldeide formica.

Poco dopo l'iniezione il paziente si lamenta di *malessere generale,* si trova *sprovvisto di forze* ed è obbligato a porsi in letto.

Gli si fa bere una tazza di latte, ma i fenomeni di *intolleranza* gastrica si manifestano immediatamente con tale intensità, che non solo il latte è subito espulso, ma d'allora in poi cominciano le *nausee* ed il *vomito* incoercibile.

Alle ore 8 di sera la temperatura è elevatissima, toccando il *maximum* di tutto il periodo febbrile (41°.2') e l'infermo comincia a lamentarsi di intensa *cefalalgia*, soprattutto alla regione frontale, di grande *ansia epigastrica*, di *rachialgia*, di *dolori muscolari* ed *articolari*, con irradiazioni lancinanti verso i membri inferiori.

A questo periodo l'infermo cade in preda ad una *violenta agitazione* generale, senza posa, che gli strappa continue lamentazioni.

Contemporaneamente si manifesta una *congestione generale*, estesa a tutta la superficie cutanea che è calda ed asciutta. Questa congestione è soprattutto intensa alla faccia ed alle congiuntive, per cui gli occhi appariscono rossi, umidi e brillanti, le pupille sono dilatate, lo sguardo è vago e incosciente e l'insieme del quadro dà alla fisionomia del paziente l'*aspetto di un ubbriaco.*

13 novembre. — Alle ore 8 del mattino la temperatura ascellare si trova a 39°.2' e gl'imponenti sintomi generali del giorno precedente, soprattutto i dolori, si sono alquanto calmati.

Però, durante la notte, la *insonnia* è stata ostinata ed è comparsa la *diarrea.* Le deiezioni, non molto abbondanti, sono affatto liquide ed oltremodo fetide e presentano un colore giallognolo, simile a quello delle deiezioni dei bambini lattanti.

La *lingua è saburrale* nella parte mediana e vivamente arrossata ai margini. Il *polso è debole,* ma regolare. A mezzodì la temperatura è risalita a 40°.

La *diuresi* ha diminuito considerevolmente e le scarse urine presentano una tinta molta oscura. L'esame dimostra presenza di *albumina*, ma assenza di pigmenti biliari.

Questa diuresi è andata diminuendo progressivamente durante tutto il giorno ed alle 4 di sera può ottenersi una quantità di urina appena sufficiente per

l'analisi che rivela tuttavia *gran quantità di albumina* ed assenza di pigmenti biliari.

A ore 5 pom. la temperatura è sempre a 40° e lo stato generale si aggrava visibilmente.

I *dolori* fanno la loro ricomparsa, più imponenti di prima, e l' infermo presenta ad ogni istante degli *accessi di delirio.*

Può rispondere appena alle nostre domande e segnala con insistenza le regioni *epigastrica, lombare* e *frontale* come le sedi principali dei dolori. La più piccola pressione in corrispondenza di tali regioni, strappa al paziente vive lamentazioni.

I *vomiti di materia biliosa* si ripetono sempre con maggiore frequenza. A ore 7 pom. tutto il corpo è in preda a *violento tremore; l'anuria* è completa, e la superficie del corpo comincia a presentare una *colorazione sub-icterica*, specialmente apprezzabile in corrispondenza delle guancie. Le pupille si vanno a poco a poco contraendo e sul far della notte appaiono degli *accessi di dispnea.*

Gli atti respiratori sono brevi, incompleti e precipitosi (40 respiraz. per minuto).

Si rende manifesto altresì un disaccordo fra il polso e la temperatura, questa è tuttavia a 40°, mentre il primo è quasi impercettibile e raro.

Durante la notte lo stato si è andato aggravando: l'*insonnia* e l' *anuria* sono state complete; i *vomiti* e la *diarrea* hanno pure continuato quasi senza interruzione.

14 novembre. — Sul fare del giorno il paziente è del tutto *prostrato di forze*, con una temperatura di 38°.4′.

Pratico asetticamente un piccolo salasso di circa 30 cmc. di sangue, che faccio coagulare in recipienti sterilizzati, per raccoglierne il siero.

Eseguisco altresì, come nel caso precedente, alcune *punture esplorative*, con tutte le precauzioni asettiche, nel *fegato* e nei *reni,* estraendo da entrambi i visceri piccole quantità di succo che mi affretto a seminare su vari mezzi nutritivi e ad esaminare al microscopio.

A ore 8 ant. il paziente comincia a presentare un po' di *collapsus.*

La cute si raffredda, le estremità divengono cianotiche, la dispnea si fa più pronunciata, le pupille si dilatano di nuovo ed il polso diviene impercettibile.

Però superata questa grave crisi, che dura alcune ore, l'infermo comincia a sentirsi un po' meglio e dopo alcuni giorni finisce col ristabilirsi bene. Frattanto io abbandono il seguito delle osservazioni per attendere alle:

Ricerche sul sangue.

Le culture praticate su vari mezzi nutritivi rimangono sterili.

La coagulazione si compie regolarmente e pone in libertà circa 15 cmc. di siero color giallo oro, assai vivace. Questo siero aggiunto alle culture fresche del *bacillo icteroide*, nella proporzione di 1:5, determina una immobilizzazione ed un agglutinamento soltanto parziale; nemmeno dopo 12 ore si verifica una totale precipitazione dei microbi in fondo al tubo.

I risultati dell'analisi chimica segnalano la presenza dell' 1,90 $^0/_{00}$ di urea.

Ricerche sul succo epatico e renale.

Le piccole quantità di succo epatico, ritirate mercè una robusta cannula sterilizzata, risultano affatto sterili nelle culture, ma l'esame microscopico, con

acido osmico, dimostra una *profonda degenerazione grassa* di tutte le cellule epatiche, le quali presentano il protoplasma affatto riempito di gocce grassose di tutte le dimensioni.

Le culture praticate con succo renale, dettero per risultato la presenza del *colibacillo* in scarsa quantità.

Osservazione V.

P. B. di 30 anni, italiano; peso kg. 64,250.

26 novembre; ore 3,30 pom. temp. ascellare 36°.8′ : 1ª *iniezione endovenosa* di 2 cmc. di cultura filtrata.

Poco dopo l' iniezione il paziente prova un po' di malessere generale, accompagnato da lieve *cefalalgia* che dura per tutto il resto del giorno. La temperatura ascellare sale quasi subito a 40°.1′ e rimane alta sino alla notte.

27 novembre: però al giorno seguente il P. si trova completamente ristabilito e senza febbre, ma l'esame delle urine dimostra tracce evidenti di *albumina* ed al labbro inferiore si presenta una pustola di *herpes febrilis.*

28 novembre, ore 4 pom. Pratico una 2ª *iniezione endovenosa* di 7 cmc. di cultura filtrata.

Subito dopo il paziente è assalito da un forte *brivido di freddo* e da un tremito generale; gli si dà a mangiare un po' di carne, ma poco dopo *vomita* tutto il contenuto dello stomaco.

Il malessere si aggrava rapidamente ed il P. deve porsi in letto, ove continua il brivido di freddo più intenso di prima. La faccia si inietta fortemente e la respirazione si rende dispnoica.

Più tardi la *febbre* arriva a 40°.7′ ed insorge una *cefalalgia* violenta, che non abbandona più l'infermo.

29 novembre. — Infatti il giorno dopo, non solamente persiste la *cefalalgia*, ma il paziente si lamenta di forti *dolori* alle articolazioni degli arti inferiori ed ai lombi. La febbre però è scomparsa, ed al labbro superiore si manifesta una seconda *herpes febrilis.*

30 *novembre.* — Il paziente è apiretico, ma presenta tuttavia un leggiero grado di cefalalgia e dolori vaghi in diverse parti del corpo.

L'urina è chiara, priva di albumina e di pigmenti biliari. La lingua è un po' saburrale.

A ore 4 pom. pratico una 3ª *iniezione endovenosa* di 15 cmc. di cultura filtrata.

Subito dopo l'iniezione il paziente è assalito da prostrazione generale e da un violento brivido di freddo, per cui è obbligato a coricarsi.

Appena in letto, si manifesta un tremito generale assai violento ed il freddo si fa così intenso che il paziente domanda incessantemente nuove coperture.

La faccia s'inietta e poco dopo comincia la reazione febbrile, accompagnata da intensa cefalalgia. Però l'accesso reattivo è assai meno intenso di

quello che seguì la iniezione precedente. La temperatura sale sino a 40. 3′ per ridiscendere poco dopo, lasciando però l'infermo debole, prostrato di forze, con dolori lombari persistenti e tormentato da continue *nausee* e conati di *vomito* che non gli permettono di alimentarsi.

3 *dicembre.* — In questo stato il paziente trascorre ancora tre giorni, senza venir mai abbandonato dalla *cefalalgia*, dai *dolori lombari*, dalle *nausee* e dalla *debolezza*, che lo obbliga ogni tanto a mettersi in letto. Le labbra si presentano ulcerate per le numerose pustole di *herpes*.

A ore 4 pom. pratico una 4ª *iniezione endovenosa* di 20 cmc di cultura filtrata.

L'ammalato si corica poco dopo, ma i fenomeni generali immediati sono molto più miti di quelli provocati dalle precedenti iniezioni. Ben presto il paziente comincia a provare della sete ardente e dopo un'ora e mezzo comincia la reazione febbrile (39 3′), accompagnata da una esacerbazione dei dolori lombari e dalla cefalalgia, che non gli permettono di riposare un istante per tutta la notte.

4 *dicembre.* — Sul fare del giorno i fenomeni generali dolorosi si dileguano a poco a poco, persiste la sete ardente, ma v'ha assoluta intolleranza verso qualunque alimento. Il paziente rifiuta persino il latte, ed il suo stomaco non può tollerare che acqua pura, che beve avidamente senza vomitare.

La temperatura ascellare è però ritornata normale (37°. 3′).

Durante tutto il giorno rimane in letto, in uno stato di grande prostrazione e non può toccare cibo alcuno. Urina normale e senza albumina.

5 *dicembre.* — Il P. si sente meglio e può lasciare il letto e prendere qualche alimento liquido. Trovasi tuttavia molto prostrato di forze.

Il primitivo color rosso del volto è scomparso e resulta sostituito da una colorazione giallognola sub-icterica, evidente sopratutto sulle guancie e sulle sclerotiche.

9 *dicembre.* — Il P. sta meglio, ma è sempre molto abbattuto.

Pratico asetticamente un salasso di 50 cmc. di sangue, da cui estraggo circa 15 cmc. di siero liquido, di color giallo-limone, ma che non dà la reazione dei pigmenti biliari

Questo siero aggiunto nella proporzione di 1 : 10 nelle fresche brodo-culture dei *bac. icteroide*, determina in sole 2 ore (alla temperatura di 3°) il fenomeno dell'agglutinamento e della immobilizzazione, precipitando in un modo così netto e completo tutti i microbi, come se fosse del siero di un animale vaccinato.

16 *dicembre.* — Il paziente si è completamente ristabilito.

Per mettere in evidenza il valore ed il significato di queste esperienze che ho avuto la fortuna di poter ottenere nell'uomo, non occorre impiegare molti argomenti.

Per chiunque abbia osservato personalmente dei casi di febbre gialla, o ne abbia bene appresa la sintomatologia nella lettura dei migliori trattati, le osservazioni III e IV corrispondono senz'altro a

due casi classici di febbre gialla gravissima, e la osservazione V a ripetuti attacchi di febbre gialla abortiva.

Siccome durante le mie ricerche in Rio Janeiro ebbi inoltre a soffrire io stesso d'uno di questi attacchi, accompagnato da tutti i sintomi specifici che li caratterizzano, così debbo dichiarare anche in base alla mia esperienza personale che, nello stato attuale della nostra scienza sperimentale, i casi surriferiti rappresentano tutto quanto si può domandare per la dimostrazione perentoria e assoluta della specificità di un veleno microbico. Queste esperienze sull'uomo hanno superato ogni più esigente aspettativa.

Nessuna descrizione clinica potrebbe dipingere a colori più vivaci l'infezione amarilla nell'uomo di quello che la dipingano le note che io ho qui semplicemente e laconicamente riportate dai protocolli delle mie esperienze; nessun medico, anche poco esperto nella conoscenza clinica della febbre gialla, avrebbe dubitato un istante nel formulare una diagnosi immediata e precisa, in una località a febbre gialla, di fronte ai soggetti delle mie esperienze.

Sulla riproduzione sperimentale della febbre gialla nell'uomo, per mezzo delle toxine elaborate in *vitro* dai microbi specifici, non possono accettarsi ormai obbiezioni di sorta. Ciò consacra quindi in maniera definitiva la specificità del microbio da me isolato, descritto e considerato come l'agente della febbre gialla.

Ma le considerazioni che scaturiscono dalle esperienze suddette non possono arrestarsi sopra un lato solo della importante questione. Esse illuminano molti punti usciti, tuttavia alquanto oscuri, dai nostri studi di patologia comparata,

Ciò che richiama anzitutto l'attenzione si è il diverso comportamento del veleno icteroide, a seconda che si inietti sotto la cute o direttamente nel sangue.

Si è ripetuta ancora più evidente nell'uomo quella imponenza dei fenomeni locali che abbiamo già segnalata, sopratutto nel cane e nel cavallo. La toxina amarilligena è quindi un veleno cellulare straordinariamente attivo, paragonabile solo, per alcuni aspetti, alla toxina difterica. Il suo contatto con gli elementi dell' organismo animale, sopratutto nelle classi superiori, determina infatti, come la toxina difterica, una violenta irritazione, seguita da processi regressivi che finiscono sempre nella necrosi e nella degenerazione grassa del protoplasma.

Ciò spiega la genesi di quella steatosi diffusa che caratterizza d'una maniera così costante la febbre gialla nell'uomo e negli animali superiori. Dà inoltre ragione perchè le iniezioni sottocutanee del veleno determinano fenomeni generali sproporzionalmente inferiori a quelli che si determinano con la medesima dose iniettata nelle vene.

È molto probabile che le proprietà straordinariamente irritanti del veleno sieno un ostacolo indiretto al suo rapido assorbimento per l'organismo, a causa dei gravi disturbi circolatori e nutritivi ch'esso determina nei tessuti con i quali viene a contatto.

Oltre a ciò è anche probabile che una gran parte del veleno si esaurisca durante gli svariati processi necrobiotici, cui dà origine lungo le prime vie della sua diffusione.

Un particolare degno del massimo interesse è quello relativo alla dose di veleno capace di determinare il quadro completo della febbre gialla più grave. La quantità che potrebbe quasi considerarsi come mortale per un uomo adulto (5 cmc.) è quattro volte inferiore alla dose minima capace di uccidere una cavia od un coniglio.

Da questo si deduce senz'altro che la razza umana è dotata di una grande sensibilità per il *veleno amarilligeno*, da non paragonarsi neppure lontanamente con quella posseduta dai piccoli animali di laboratorio. Oltre a ciò le suddette esperienze ci insegnano che è inutile concentrare od esaltare prodotti microbici per ottenere negli animali inferiori effetti paragonabili a quelli che si sviluppano nell'uomo, e che non deve esigersi come regola generale, la dimostrazione specifica di un veleno microbico dagli animali di laboratorio.

In quanto poi ai sintomi ed alle lesioni della intossicazione amarilla sperimentale, i resultati ottenuti nell'uomo confermano in maniera definitiva quanto abbiamo avuto occasione di rilevare sopratutto, a riguardo delle esperienze nei cani.

Risulta cioè che i fenomeni più impressionanti della febbre gialla: il *vomito negro* e la enterorragia, non sono affatto dovuti agli effetti del virus specifico esistente nella cavità gastro-intestinale, ma si producono in virtù delle energiche proprietà infiammatorie, degenerative, emorragipare ed emetiche del veleno specifico elaborato e circolante nel sangue.

Si tratta quindi di una vera e propria gastro-enterite ematogena.

Le proprietà degenerative manifestano il *maximum* della loro azione specifica anzitutto sulla cellula epatica, sia perchè presenti una sensibilità più spiccata di ogni altro elemento anatomico, sia, come è forse più probabile, perchè il fegato, quale organo destinato più di ogni altro alla distruzione ed alla eliminazione dei veleni microbici, rimanga assai più profondamente usurato da un lavoro che è superiore alle proprie forze.

Dopo il fegato, un altro organo precocemente maltrattato nella febbre gialla di tutti gli animali superiori e sopratutto dell'uomo, è senza dubbio il rene.

L'albuminuria è infatti uno dei segnali più precoci dell'amarillismo, e la nefrite parenchimatosa rivelataci dall'anuria che preannuncia quasi infallibilmente il termine fatale della malattia, indica il principio di quella intossicazione uremica che abbiamo del pari riprodotta sistematicamente, con piccole dosi di toxina, negli animali superiori e nell'uomo.

È infatti molto probabile che la causa immediata della morte, nella maggior parte dei casi di febbre gialla, sia precisamente la insufficienza renale, che favorisce la ritenzione nel sangue delle sostanze estrattive normalmente eliminate con le urine e che sono, come è noto, molto nocive all'organismo.

Le quantità di urea molto superiori a quelle che si riscontrano normalmente nel sangue (0, gr. 189 $^0/_{00}$ secondo GRÉHANT) (1) sarebbero niente altro che un *indice* di questa intossicazione.

Siccome la sintomatologia della intossicazione uremica presenta molte analogie col quadro clinico della febbre gialla (cefalalgia, delirio, dispnea, vomito, stomatite, diarrea, ecc.), e d'altro canto il rene è uno dei primi organi ad essere colpiti invariabilmente dalla toxina icteroide, così è assai difficile stabilire, *a priori*, quali sono nel secondo periodo della malattia i sintomi dovuti alla insufficienza renale e quali quelli prodotti dal veleno amarilligeno.

È però molto probabile che una buona parte della sintomolo-

---

(1) La cifra più elevata osservata dallo stesso autore nelle sue esperienze di nefrotomia è stata quella di gr. 2. 76 $^0/_{00}$, quantità inferiore a quella che abbiamo trovato molte volte nelle nostre esperienze negli animali superiori e nell'uomo.

gia amarilla, sia prodotta dalla insufficienza renale, anzichè dal veleno specifico.

Infatti abbiamo visto che nei piccoli roditori, nei quali non si verifica mai la insufficienza renale, la malattia sperimentale si svolge ciclicamente come nell'uomo, ma senza riprodurre uno solo dei molteplici sintomi clinici che sono l'appannaggio della febbre gialla degli animali superiori, nei quali la lesione del rene, costituisce un fenomeno tra i più precoci.

Oltre a ciò nella storia clinica che accompagna la osservazione V, abbiamo visto come, mercè la iniezione di piccole dosi di culture filtrate, sia stato possibile abituare rapidamente l'uomo a tollerare una dose certamente più volte mortale di veleno amarilligeno,

Poichè, come vedremo in altre occasioni, tal fatto non può ascriversi alla immediata manifestazione di un potere antitossico da parte dell'organismo, nè ad una fenomenale accostumanza del sistema nervoso verso il veleno specifico, così è sommamente probabile che la tolleranza di una dose di veleno più volte mortale, abbia potuto verificarsi in questo caso, senza la manifestazione dei sintomi generali imponenti, mercè la parziale integrità in cui si mantenne il filtro renale durante tutto il periodo della esperienza.

Comunque voglia interpretarsi infine il quadro finale della intossicazione amarilla, rimane intanto assodato che sono sufficienti dosi molto piccole di toxine per ottenere nell'uomo una sollecita accostumanza anche verso forti dosi di veleno icteroide, da considerarsi come più volte mortali.

VI.

Le infezioni miste nella febbre gialla.

La microbiologia della febbre gialla nell'uomo e negli animali superiori, presenta, come abbiamo visto, un carattere che ha solo qualche punto di contatto, coi reperti bacteriologici di un'altra malattia specifica: la difteria.

La straordinaria tendenza alle infezioni miste e la facilità con la quale esse si effettuano quasi regolarmente, hanno costituito -

sin'oggi l'ostacolo principale alle nostre conoscenze sulla etiologia del tifo icteroide.

Abbiamo visto infatti che in quasi tutti i casi, la invasione di certe specie microbiche si compie con tale rapidità ed in numero così imponente, anche durante la vita, per cui è da domandarsi come si comporti il *bacillo icteroide* di fronte a questi nuovi ospiti, che si moltiplicano e si diffondono così liberamente nell'ambito del suo primitivo dominio.

Dal complesso di tutte le ricerche, che io ho raccolto in questa memoria, risulta che si possono stabilire tre differenti tipi bacteriologici della febbre gialla nell'uomo.

Il *primo tipo* è quello che potremmo chiamare quasi normale, perchè trova una riproduzione esatta e costante nelle nostre esperienze di laboratorio soprattutto nelle cavie, nei conigli e talora nella scimmia. Cioè il *bacillo icteroide*, dopo essersi rifugiato in qualche viscere, a produrvi, durante il classico periodo ciclico, il veleno specifico, che è la causa principale di tutta la fenomenologia morbosa, giunto alla fine di detto periodo si moltiplica improvvisamente, si diffonde per tutto l'organismo, accompagnato o no da qualche altro microbo sopraggiunto all'ultim'ora, e compie l'atto finale del suo ciclo biologico, uccidendo il paziente.

Il *secondo tipo* è rappresentato da quei casi nei quali il reperto bacteriologico del cadavere è quello di una setticemia pura o di una infezione mista generale, con scomparsa (?) o somma scarsezza del bacillo specifico. In questi casi, che sono i più frequenti, la ricerca e l'isolamento del bacillo icteroide è impossibile, o sommamente difficile.

Abbiamo detto altrove che ciò potrebbe spiegarsi ammettendo che le infezioni secondarie si manifestino allorquando il *bacillo icteroide* non è ancora giunto al fine di quel suo ciclo biologico in cui si effettua la sua moltiplicazione e la sua diffusione nell'organismo.

Questo concetto camminerebbe infatti d'accordo con i risultati bacteriologici di quello che abbiamo chiamato *terzo tipo* in cui l'organismo risulta quasi sterile e la morte può quindi considerarsi come dovuta piuttosto alla insufficienza renale.

Però è a domandarsi se l'accidentale irruzione di microbi stranieri nel sangue e la consecutiva formazione di sostanze tossiche specifiche, non potrebbero influire di per sè sole per determinare

la totale o parziale scomparsa del *bacillo icteroide*, attenuandone il potere vegetativo od uccidendolo addirittura.

Abbiamo infatti insistito più di una volta, nel corso delle nostre ricerche sui cadaveri, circa il fatto che il *bacillo icteroide* appena isolato, soprattutto se si ritrova in piccolo numero e misto ad altre specie microbiche, presenta da principio grandi difficoltà a crescere nel brodo peptonizzato semplice.

Era perciò interessante, per la biologia del *bacillo icteroide* e per una più esatta interpretazione dei complessi reperti bacteriologici della febbre gialla, studiare i rapporti reciproci fra il suo agente specifico ed i microbi che si riscontrano più comunemente come cause di infezione secondarie nell'uomo e negli animali superiori.

Le mie prime ricerche vennero instituite *in vitro* e a tale scopo studiai in varie maniere il comportamento del *bacillo icteroide* col *colibacillo*, lo *streptococco*, lo *stafilococco aureo* ed il *proteus vulgaris*.

Convenzionalmente possono stabilirsi, per comodità di definizione, due forme di antagonismo fra specie microbiche diverse, un *antagonismo vitale*, che si rivela allorquando una specie non può vivere o prosperare là dove vive e prospera un'altra, e un *antagonismo chimico* che si manifesta allorchè una specie non può vivere o prosperare laddove ha vissuto e prosperato un'altra.

Quantunque queste due forme di manifestarsi dell'antagonismo microbico, possano sembrare in fondo come dovute ed una medesima causa, vale a dire ai prodotti tossici, tuttavia risulta da esperienze di vari autori che in realtà le cose non si svolgono così semplicemente.

Un germe che non può nè vivere nè prosperare laddove vivono altri microbi, può benissimo trovare tutte le migliori condizioni di vita e di moltiplicazione nelle loro culture sterilizzate (1).

Vedremo infatti che, nel caso nostro, le esperienze *in vitro* rendono necessaria tale distinzione.

Per istudiare l'*antagonismo chimico* ho proceduto nella seguente maniera : dopo aver fatto sviluppare durante tre giorni nella stufa, su gelosio solidificato obliquamente, le culture dei microbi da spe-

---

(1) Vedi *De Giaxa*. Ueber das Verhalten, ecc. (*Zeitsch. fur Hygiene*, 1892, VI, p. 207 e seg.).

rimentare, ho liquefatto di nuovo il mezzo nutrivo, sterizzandolo allo stesso tempo, e risolidificandolo poscia obliquamente.

Su questi nuovi mezzi ho in seguito coltivato le varie specie, secondo una serie completa di combinazioni, le quali mi permettessero di saggiarle tutte reciprocamente.

Il risultato complessivo di queste ricerche è riassunto sommariamente nella seguente tabella:

Culture su gelosio sterilizzate e quindi risolidificate, dei seguenti microbi	ESITO DELLE SEMINAGIONI ESEGUITE CON			
	Stafilococco aureo	Bacillo icteroide	Colibacillo	*Proteus vulgaris*
	(*)			
Stafilococco aureo	+ +	—	+	+ +
Bac. icteroide	+ + +	+	+	+ +
Colibacillo	+ +	—	+	+ +
Proteus vulgaris.	+	—	tracce	+ +

Dalla quale si deduce che i prodotti solubili del *bacillo icteroide* sono quelli che meno ostacolano lo sviluppo di tutti gli altri microbi, mentre quelli del *proteus vulgaris* sembrano i più velenosi e nocivi. Quest'ultimo e lo *stafilococco aureo* si sviluppano infatti ottimamente laddove si sono sviluppati tutti gli altri e *soprattutto* laddove si è sviluppato il *bac. icteroide*. Questo invece non è affatto capace di vivere laddove esistono prodotti solubili degli *stafilococchi*, dei *colibacilli* e dei *protei*.

Risulta quindi da tutto ciò, che, di fronte ai vari microbi presi in esame, il *bac. icteroide* si trova sempre in condizioni biologiche di resistenza assolutamente inferiori.

È dunque possibile che una delle cause per cui, dai cadaveri di individui soccombuti alla febbre gialla, non si riesce così facilmente ad isolare il microbio specifico, consista precisamente nella energica azione bactericida dei prodotti tossici elaborati nello stesso organismo dagli altri ben noti microbi, che vi si riscontrano costantemente, come agenti di infezioni secondarie.

(1) Il numero delle + indica la intensità della cultura sviluppata.

Siccome è indiscutibile che molti infermi di febbre gialla soccombono realmente all'improvviso di setticemia a *streptococco*, a *colibacillo*, ecc., è facile comprendere come la rapida ed imponente moltiplicazione di questi microbi debba inondare l'organismo di tale quantità di prodotti tossici, da uccidere od attenuare notevolmente i pochi microbi specifici situati molto probabilmente nell'interno di qualche viscere e non ancora pervenuti al loro periodo di riproduzione attiva.

In quanto all'altra forma di antagonismo, l'*antagonismo vitale*, è facile porlo in evidenza sia coltivando ad un tempo due o più specie microbiche in uno stesso mezzo liquido, sia praticando sopra una placca di gelosio già solidificata, due seminagioni successive *in croce*, per istrisciamento, perpendicolari fra loro e ricavate da due culture differenti che si vogliano volta per volta sperimentare.

Il primo metodo è facilmente applicabile soltanto fra due microbi morfologicamente molto diversi fra loro, come per es. fra lo *streptococco* ed il *bac. icteroide*.

Relativamente al modo di comportarsi di questi due microbi, le mie ricerche *in vitro* hanno condotto ai seguenti risultati:

1° nei tubi di gelosio sterilizzati e risolidificati, dopo avervi coltivato per sette giorni il *bac. icteroide*, lo *streptococco* si sviluppa molto più rapidamente ed abbondantemente che non nei tubi di gelosio nuovi seminati per controllo;

2° coltivando insieme, in un medesimo tubo di brodo-lactosato, il *bac. icteroide* e lo *streptococco*, quest'ultimo si sviluppa in maggiore abbondanza e forma delle catene straordinariamente più lunghe di quelle che si osservàno nei tubi di brodo lactosato, seminati, come sopra, per controllo;

3° seminando il *bac. icteroide* in vecchie culture di *streptococco* (di 4, 6, 13 giorni) in brodo-lactosato non sterilizzato, e nelle quali le catenelle si sono completamente depositate al fondo, ridonando al liquido la primitiva trasparenza, esso non vi si sviluppa affatto e non altera minimamente questa trasparenza;

4° seminando lo *streptococco* in vecchie culture (di 11 giorni) non sterilizzate, di brodo-lactosato, in cui si è sviluppato il *bacillo icteroide*, lo *streptococco* vi si sviluppa rapidamente ed abbondantemente, formando dei filamenti di lunghezza straordinaria;

5° soltanto coltivando insieme il *bac. icteroide* e lo *streptococco*

in brodo semplice peptonizzato, ove quest'ultimo cresce con molto maggiore difficoltà che non nei brodi zuccherati, il *bac. icteroide* si sviluppa in maggiore abbondanza, avendo sopravvento sullo *streptococco*. Concludendo quindi si deduce:

1° che allorquando le condizioni di sviluppo sono uguali, lo *streptococco* prende sempre il sopravvento sul *bac. icteroide*;

2° che lo *streptococco* può svilupparsi bene laddove si è sviluppato il *bac. icteroide*, mentre succede il contrario riguardo a quest'ultimo.

Ma un antagonismo vitale, ancora più sviluppato dello *streptococco*, è quello dello *stafilococco aureo* col *b. icteroide*.

Per dimostrarlo in una maniera evidente non si deve far altro che eseguire due seminagioni *in croce*, per istrisciamento, sopra una lastra di gelosio, con l'ago di platino intriso successivamente in una cultura in brodo di entrambi i microbi.

Qualunque sia il modo con cui venne praticata la seminagione. *lo stafilococco aureo si propaga ed invade sistematicamente anche la linea d'innesto del bac. icteroide*, cosicchè dopo 24 ore la lastra di gelosio, invece di presentare due strie perpendicolari, l'una gialla e l'altra grigio-iridescente, presenta la figura di una croce completamente gialla.

Ho provato a fare gl'innesti in croce, con la distanza di 24 ore l'uno dall'altro, od eseguendo le seminagioni invertendone l'ordine, ma ho ottenuto continuamente gli stessi risultati; allorquando lo *stafilococco aureo* arriva a congiungersi con una cultura di *bac. icteroide*, la invade completamente e quasi la sopprime, sotto il suo rigoglioso sviluppo; quest'ultima specie, al contrario, a misura che il suo tratto d'innesto si avviciua a quello dello *stafilococco*, presenta uno sviluppo sempre più limitato e meschino.

Fra il *bac. icteroide* e lo *stafilococco aureo* esiste perciò un antagonismo vitale svilupatissimo, con vantaggio completo del secondo.

Dopo lo *stafilococco* e lo *streptococco*, ho voluto studiare col *bac. icteroide* il comportamento di un altro microbio che si ritrova così facilmente nelle infezioni miste della febbre gialla: il *colibacillo*.

È da premettersi che il *colibacillo* non presenta nessun antagonismo con lo *stafilococco aureo*: le due specie possono svilupparsi parallelamente promiscuamente e indipendentemente, così nelle culture in brodo,. come nelle seminagioni eseguite in croce alla superficie delle lastre di gelosio.

Tuttavia nello studio dei rapporti fra il *bac. icteroide* ed il *colibacillo*, si rivela un'antagonismo manifesto, quantunque minore di quello già segnalato fra *stafilococco aureo* e *bac. icteroide*.

Infatti seminando in croce sulle placche di gelosio il *bac. icteroide* ed il *colibacillo*, si ottengono sempre *tre* bracci occupati da quest'ultimo ed *un* solo braccio occupato dal primo.

Si riconoscono molto bene, anche senza ricorrere ai trasporti in brodo lactosato (che decidono sempre rapidamente ogni dubbio), i bracci occupati dal *colibacillo*, perchè essi sono più larghi, più frastagliati e più abbondanti di quelli occupati dal *bac. icteroide*.

I risultati di queste ricerche spiegano quindi a sufficienza i reperti negativi del *bac. icteroide* che debbonsi purtroppo lamentare a varie riprese durante le ricerche sul cadavere e che probabilmente hanno rappresentato sin'ora l'ostacolo principale alla scoperta dell'agente specifico della febbre gialla.

Però non possono rendere ragione di un altro fenomeno, che accompagna quasi costantemente il quadro bacteriologico di questa malattia: cioè della causa delle infezioni miste.

Perchè la febbre gialla deve considerarsi come il tipo classico di una malattia, che finisce sempre con una infezione mista?

La circostanza che in essa si ritrova un veleno molto attivo, capace di favorire le invasioni microbiche secondarie, non deve esagerarsi troppo, perchè anche in tutte le altre malattie infettive nelle quali la infezione mista non è la regola, il periodo finale è caratterizzato dalla soppressione graduale e progressiva di ogni resistenza cellulare.

D'altro canto esistono altre malattie di natura eminentemente tossica, come per es. il tetano, nelle quali l'organismo non è invaso dalla flora microbica intestinale.

Neppure è da attribuirsi soverchia importanza alle lesioni dell'apparato digestivo, perchè nella febbre gialla non sempre esse sono notevoli, ed in secondo luogo perchè si conoscono altre malattie a localizzazioni intestinali molto più gravi (cholera, febbre tifoidea, avvelenamenti, ecc.), nelle quali le infezioni miste non sono affatto la regola e in ogni caso non assumono quello sviluppo che abbiamo a lungo studiato nella febbre gialla.

Per risolvere in maniera sperimentale questo ultimo punto oscuro nella patogenesi della febbre gialla, io ho eseguito molte

ricerche nelle cavie e nei conigli (i soli animali nei quali sia possibile stabilire quasi esattamente in precedenza il giorno della morte), inoculando dapprima la dose mortale del *bac. icteroide* e poscia, a differenti intervalli avanti la morte, piccole dosi, non mortali, di *colibacillo*, di *protei*, di *stafilococchi*, ecc.

Però i risultati ottenuti furono inconcludenti; il *bac. icteroide* fu sempre quello che al fine del periodo ciclico invase in coltura pura l'organismo, uccidendo l'animale. La generalizzazione degli altri microbi non potei constatarla che eccezionalmente.

Oltre a ciò, come risulta dai protocolli di questa memoria, abbiamo visto che nella cavia e nel coniglio, qualunque sia la durata della malattia, il reperto bacteriologico del cadavere è sempre quello del *bac. icteroide* allo stato di assoluta purezza. Nel cane, nella capra e nella scimmia invece, è frequente ritrovare il bacillo specifico misto allo *streptococco*, al *colibacillo* od allo *stafilococco*.

Infine nella esperienza n. IV instituita nell'uomo, abbiamo visto che la sola iniezione del veleno amarilligeno fu capace di determinare la presenza del *colibacillo* nei reni.

Ora, ponendo mente a tutti questi vari risultati e paragonando fra loro le cause che potrebbero considerarsi come capaci di favorire soltanto su *determinate specie animali* la comparsa di infezioni secondarie, è risultato che esiste una sola distinzione fondamentale fra il reperto anatomico degli animali che muoiono con quadro batteriologico puro e quelli che muoiono con grado batteriologico misto, e questa distinzione consiste nella lesione epatica.

Infatti nella cellula epatica della capra, del cane, della scimmia e dell'uomo, il veleno amarilligeno determina una profonda lesione degenerativa, mentre risulta quasi senza azione sulla cellula epatica dei piccoli roditori. È perciò che nei primi l'infezione spontanea secondaria è frequente e il decorso della malattia è perciò subordinato ad altri fattori, mentre nei secondi l'infezione secondaria non si verifica; e la malattia compie regolarmente il suo ciclo evolutivo.

Siccome infine un gran numero di fatti importanti ci autorizza oggi a considerare il fegato come un organo dotato di una funzione attiva, non solo contro i veleni, ma anche contro gli stessi microbi patogeni, non è ingiustificato ritenere la lesione specifica della cellula epatica come la causa principale delle costanti invasioni

microbiche secondarie, in una malattia che si distingue appunto da tutte le altre per i profondi e costanti processi degenerativi specifici, che hanno sede nel più importante organo di difesa, soprattutto contro le invasioni dei microbi intestinali.

VII.

La febbre gialla a bordo delle navi.

La propagazione marittima della febbre gialla è ormai un fatto solidamente stabilito; per ciò non rimane che a ricercarne la causa sulla scorta delle conoscenze che siamo venuti acquistando sin'ora intorno alla biologia del suo microbio specifico.

Il comportamento della febbre gialla a bordo delle navi, differisce da quello di un'altra grave malattia epidemica, il cholera, in ciò che quest'ultimo, una volta introdotto a bordo, esplode, colpendo rapidamente tutti quelli che, quasi si direbbe, deve colpire.

La gravità di questa esplosione varia a seconda della quantità e dell'energia del vibrione cholerico e secondo la predisposizione dei soggetti; ma alfine, una volta compiuto questa specie d'atto di presenza, i vibrioni cholerici non sembrano riscontrare nelle condizioni ordinarie del mezzo nautico, un terreno molto favorevole alla loro esistenza.

Difettando questa specie di intermediario fra l'uomo e l'agente cholerigeno, specialmente se si attuano buone misure di disinfezione, la malattia si estingue.

La febbre gialla, al contrario, una volta istallatasi a bordo di una nave, vi si mantiene lungamente e tenacemente, conservandosi soprattutto nella stiva, nei magazzini, nelle mercanzie, in ogni ambiente chiuso e ristretto. È comune infatti la nozione che qualifica sopratutto le navi vecchie ed usate, come le più facili a contaminarsi e le più improprie a servire nei paesi ove la febbre gialla è endemica.

Coloro che si occupano soprattutto di igiene navale, considerano infatti come *bastimenti a febbre gialla* i tipi di navi insufficientemente aereate, munite di aperture troppo piccole, ove stagna nelle

parti superiori dell'aria viziata e in quelle inferiori una fetida umidità. Umidità, calore, oscurità e mancanza di ventilazione, sembrano perciò i coefficienti più proprî alla conservazione del *bacillo icteroide.*

Ma nello stato attuale delle nostre conoscenze, non è possibile attribuire a questi vari coefficienti alcun valore specifico, inquantochè essi rappresentano altrettante condizioni che potrebbero militare a favore di tutti i microbi in generale. Occorre perciò ricercare in qualche altro elemento concomitante, la causa che favorisce in una maniera quasi specifica l'*habitat* nautico del *bacillo icteroide.*

Un semplice fenomeno che ha richiamato a varie riprese tutta la mia attenzione, durante questi studi, mi ha spiegato, in modo originale, la causa probabile di questa misteriosa longevità e resistenza del *bacillo icteroide* a bordo delle navi.

Il bacillo della febbre gialla, come la maggior parte dei microbi patogeni, affinchè possa vivere e svilupparsi bene, sopratutto sui mezzi solidi, ha bisogno di calore, di umidità e di materiale nutritivo conveniente. Le prime due condizioni possono essere anche relative, ma quest' ultima è assoluta. La gelatina ordinaria, per esempio, non può considerarsi come un mezzo nutritivo molto favorevole, allorchè è mantenuta alla temperatura dell'ambiente. Succede infatti con una certa frequenza, durante le ricerche correnti, che le culture a piatto vi rimangono affatto sterili, pur essendo talora enorme la quantità dei germi seminativi. In tal caso la gelatina, anche in condizioni di temperatura ottime, può rimanere sterile per sempre.

Non mi è stato possibile stabilire la ragione di questo fatto veramente strano, che si verifica soprattutto allorquando le culture a piatto vengono eseguite direttamente, seminando sangue di cane o di coniglio, morti per infezione generale. Va da sè che la presenza di grandi quantità di microbi nel materiale di seminagione, era regolarmente controllato dalle contemporanee culture per strisciamento praticate su gelosio.

Comunque infine si verifichi questo inesplicabile fenomeno, il fatto è che le scatole di Petri possono talora rimanere durante varie settimane, senza presentare alla superficie lo sviluppo di una sola colonia.

Come succede però quasi sempre in questi casi, dopo una per-

manenza così lunga in un ambiente mal riparato dal pulviscolo atmosferico, in mezzo alla vecchia lastra di gelatina, finisce con lo svilupparsi qualche muffa. Ma non appena la muffa comincia a sviluppare il suo micelio, attorno ad esso comparisce immediatamente nella gelatina, una corona di piccole colonie puntiformi, appartenenti al *bacillo icteroide*. A misura che la muffa cresce, queste colonie divengono sempre più numerose. estendendosi rapidamente la zona da esse occupata attorno al cespuglio centrale formato dalla muffa.

Dopo qualche giorno, le lastre di gelatina ove si sono sviluppate accidentalmente delle muffe, presentano quindi un aspetto oltremodo curioso. All'intorno di ciascuna muffa le colonie del *bacillo icteroide*, che si sarebbero potute credere già morte o incapaci affatto di svilupparsi dopo tanto tempo, costituiscono una specie di costellazione, tanto più difficile a numerare, quanto più prossima essa trovasi alla sede occupata dalla muffa.

Si direbbe quindi che le muffe esercitano una specie di *raggio d'influenza*, nell'orbita del quale è soltanto possibile lo sviluppo delle colonie icteroidi. Questo raggio d' influenza è più o meno esteso, a seconda della specie di muffa e dello spazio da essa occupato, ma è sempre perfettamente regolare, uniformemente distribuito ed equidistante dal centro, rappresentato dal cespuglio del fungo. Fuori di qusto *raggio d'influenza*, che è sempre nettamente limitato, cessa infatti bruscamente lo sviluppo delle colonie microbiche ed il rimanente della gelatina seguita a rimanere sterile, sino a che qualche nuova spora non dà luogo alla formazione di nuovi miceli, che alla lor volta rimangono immediatamente circondati e racchiusi da una nuova pullulazione di colonie icteroidi.

Questa proprietà favoreggiante delle muffe verso il *bacillo icteroide*, può dimostrarsi anche sperimentalmente, seminando addirittura le spore di una muffa qualunque in mezzo ad una lastra di gelatina seminata in precedenza con microbi icteroidi, ma rimasta da lungo tempo affatto sterile.

È assai probabile che tale facoltà costituisca un carattere specifico posseduto da tutte le muffe in generale, giacchè le sei specie che ho accidentalmente isolate in laboratorio si sono mostrate, quantunque in grado diverso, ugualmente capaci di fornire la reviviscenza e la moltiplicazione dei microbi icteroidi altrimenti incapaci di svilupparsi.

È inoltre possibile che esista in natura, sopratutto nelle località ove la febbre gialla si installa con grande vigore, qualche muffa sin' ora sconosciuta e dotata di un potere favoreggiante veramente specifico e molto più notevole.

Questo strano fenomeno di *parassitismo* che potrebbe definirsi « *per imprestito dei mezzi di esistenza* », questa forma bizzarra di saprofismo microbico, è possibile che rappresenti la causa principale del facile acclimatamento della febbre gialla a bordo delle navi.

È infatti sommamente probabile che, soprattutto nella stiva dei bastimenti male aereati, non sia il solo leggendario caldo-umido, considerato nei suoi effetti fisico-chimici, quello che mantiene sì lungamente in vita i microbi della febbre gialla accidentalmente arrivati sino ad essa. Nella stiva dei bastimenti, malgrado il caldo-umido, non prosperano nè si mantengono attivi per lungo tempo, altri microbi patogeni, come quelli del cholera, del tifo, ecc.

Rispetto alla febbre gialla, il caldo-umido e la scarsa aereazione potrebbero perciò considerarsi anzitutto come condizioni indispensabili allo sviluppo delle muffe, e poscia come *indirettamente* favorevoli alla vitalità dei *bacilli icteroidi.*

Questo fenomeno di commensalismo, molto analogo a quello che *Metchnikoff* ha già segnalato da tempo pel vibrione cholerico, spiega inoltre e si trova d'accordo con molte altre ben note osservazioni pratiche fornite dalla storia epidemiologica della febbre gialla e sulle quali credo inutile diffondermi più a lungo.

VIII.

Resistenza del bacillo icteroide agli agenti fisico-chimici naturali.

Allo scopo di completare le nostre conoscenze intorno alla biologia di un microbio contro il quale dovrà d'ora innanzi stabilirsi, sopra basi scientifiche, un'attiva difesa in tutte le località funestate dalla febbre gialla, ho creduto opportuno far seguire alcune ricerche circa la sua resistenza al calore, all'essiccamento, alla luce ed all'acqua di mare.

La maggior parte di queste ricerche sono state eseguite dal

mio ottimo preparatore Sig. E. Puppo, con quella esattezza che lo distingue.

a) *Resistenza del b. icteroide al calore umido.*

Il metodo seguito è quello impiegato in tutti i laboratori, e consiste nel riscaldare a bagno-maria dei piccoli tubi di vetro sottile contenenti brodo-culture del *bacillo icteroide*

I risultati ottenuti sono riassuuti nella seguente tabella n. 1.

TABELLA N. 1.

Durata dell'azione del calore	RISULTATO DELLE CULTURE ESEGUITE DOPO L'AZIONE DELLE SEGUENTI TEMPERATURE:				
	50°.	55°.	60°.	65°.	70°.
0 (controllo)	+	+	+	+	+
1 minuto	+	+	+	—	—
3 »	+	+	—	—	—
5 »	+	+	—	—	—
8 »	+	+	—	—	—
10 »	+	+	—	—	—
15 »	+	+	—	—	—
20 »	+	—	—	—	—
25 »	+	—	—	—	—

Ciò che dimostra come l'agente specifico della febbre gialla, come quelli della difteria, della morva, del tifo, del cholera, ecc., sia uno dei meno resistenti all'azione del calore umido. Infatti la temperatura relativamente poco elevata di 60° lo uccide in pochi istanti e quella di 65° lo uccide immediatamente.

b) *Resistenza del b. icteroide al calore secco.*

Questa serie di ricerche venne eseguita con fili di seta imbevuti in brodo-culture, poscia essiccati nella stufa a 37° e infine sottoposti al calor secco in una comune sterilizzatrice ad aria calda.

L'estrazione di ogni filo di seta dalla stufa, a misura che il calore andava lentamente crescendo di 5 in 5 gradi, veniva effettuata in maniera da non arrestare nè abbassare sensibilmente la temperatura dell'apparato.

I risultati delle seminagioni, ripetutamente confermati, dimostrarono che il *bacillo icteroide* esposto al calore secco muore soltanto fra i 120° ed i 125° C.

È necessaria 1 ora e 10 minuti per ucciderlo alla temperatura di 100°.

Ciò conferma la cattiva reputazione dell'aria calda, quale agente di sterilizzazione.

c) *Resistenza del b. icteroide all'essiccamento.*

Queste ricerche presentano un grande interesse epidemiologico, di cui è affatto superfluo segnalare la causa.

Nei paesi a febbre gialla si citano spesso casi di contagio sopravvenuti in individui i quali erano ritornati ad occupare ambienti ove era morto da parecchi mesi qualche infermo di tifo icteroide.

Queste esperienze vennero praticate, al solito, con fili di seta, esposti entro due capsule di vetro sterilizzate, alla temperatura della stufa di 37° 5′ ed a quella dell'ambiente in una stanza dell' Istituto.

I risultati furono i seguenti,

Le seminagioni coi fili esposti all'essiccamento, alla temperatura di 37°. 5′ cominciarono a rimanere sterili dopo 37-35 giorni.

Dopo 40 giorni rimasero sterili 8 fili su 20. Dopo 50 giorni tutti i fili erano del tutto sterili.

Le seminagioni con fili disseccati nella stufa a 37° durante 24 ore e quindi esposti alla temperatura variabile dell'ambiente sono state sempre positive, dopo 168 giorni, (dal 23 ottobre 1896 fino al giorno d'oggi 30 di marzo 1897).

Questo ci autorizza a credere che l'essiccamento spontaneo alla temperatura dell'ambiente, permette al *bacillo icteroide* una validità oltremodo notevole; e dal punto di vista dell'igiene pratica il fatto presenta una grande importanza perchè rende supponibile il contagio della febbre gialla per mezzo delle polveri atmosferiche.

d) *Resistenza del b. icteroide all'azione della luce solare diretta.*

L'azione della luce solare sul *bacillo icteroide*, coltivato su mezzi solidi e liquidi, ha dato risultati sempre incostanti, quantunque in tutti i casi si abbia avuto una più o meno sollecita sterilizzazione delle culture. Questi risultati incostanti si comprendono perfettamente considerando che l'azione bactericida della luce solare sulle culture microbiche si effettuerebbe solo in virtù di svariati e certo incostanti processi di ossidazione che si verificano nel mezzo nutritivo.

Ho perciò preferito impiegare anche in questo caso i fili di seta, previamente essiccati a 37°, e quindi esposti al sole.

I risultati sono esposti nella seguente:

TABELLA N. 2.

Durata dell' azione solare	Temperatura esterna (al sole)	Risultato delle culture	Durata dell'azione solare	Temperatura esterna (al sole)	Risultato delle cultura
o (controllo).	28°.1'	+	ore 5.30' . . .	27°.2'	+
30 minuti . .	28°.0	+	» 6.0 . . .	27°.5'	+
ore 1.0. . . .	27°.6'	+	» 6.30'. . .	27°.7'	+
» 1.30'. . .	28°.0	+	» 7.0 . . .	28.°2'	+
» 2.0 . . .	27°.5'	+	» 7.30'. . .	27°.4'	—
» 2.30'. . .	28°.0	+	» 8.0 . . .	28°.5'	—
» 4.30'. . .	27°.8'	+	» 8.30' . .	27°.3'	—
» 5.0 . . .	27°.4'	+	» 9.0 . . .	27°.2'	—

La luce solare diretta, alla temperatura estiva, uccide dunque il *bac. icteroide* allo stato secco in poco più di 7 ore.

La sua azione sterilizzatrice sarebbe quindi quasi uguale a quella che, secondo i risultati di vari autori, si eserciterebbe sul *bac. carbonchioso*, e molto più attiva di quella che, secondo altri, si eserciterebbe sul *bac. prodigiosus*, sul *bac. pyocyaneus*, sugli *stafilococchi* e sul *vibrione cholerico*.

e) *Resistenza del bac. icteroide nell'acqua di mare.*

Siccome la febbre gialla è stata sempre considerata una malattia i cui rapporti con le località marittime non è più il caso di discutere, così ho creduto conveniente studiare il modo di comportarsi del suo agente specifico con l'acqua di mare, che potrebbe rappresentare un veicolo di contagio meritevole di richiamare tutta la nostra attenzione.

In tesi generale sappiamo per un pregevole studio di *De Giaxa* (1) che alcuni microbi patogeni (cholera, carbonchio, tifo, stafilococco aureo) vivono assai bene e possono anche prosperare nell'acqua di mare, allorquando non si trovano impegnati in una lotta di concorrenza vitale con altri germi antagonisti. Ma questa lotta di concorrenza vitale non sempre rappresenta la regola. Lo stesso *De Giaxa*, ha trovato, per esempio, che se nell'acqua di mare esistono da un lato, alcuni microbi antagonisti al *bac. carbonchioso*, ve ne hanno però altri che consentono perfettamente bene il suo sviluppo.

Anche METCHNIKOFF (2), com'è noto, ha osservato che trovansi nell'acqua dei microbi anagonisti e favoreggianti ai vibrioni del cholera.

Per conseguenza è affatto impossibile riprodurre sperimentalmente tutte le condizioni e tutte le vicende biologiche cui trovasi esposto un microbio patogeno, durante la sua esistenza nel mezzo idrico.

La costituzione del mezzo, il molteplice e svariato contatto della flora acquatile, la diluzione, il movimento, le vicende della polluzione, l'influenza della luce, le variazioni di temperatura, di profondità ed infiniti altri fattori, rappresentano altrettante condizioni che non è affatto possibile riprodurre *in vitro*, ma che d'altro canto sono in grado d'influire favorevolmente o sfavorevolmente sui microbi, sia isolatamente, sia in virtù di una serie di combinazioni che potrebbero variare all'infinito.

È perciò evidente che una mescolanza artificiale di acqua di mare naturale con un microbio patogeno, in un matraccio, ove i

---

(1) « Ueber das Verhalten einiger path. Mikroorg. im Meerwasser » (*Zeitschr. f. Hygiene* 1889, VI, p. 162.

(2) « Sur l'immunité et la receptivité vis-à-vis du choléra intestinal » (*Annales de l'Inst. Pasteur*, 1894, p. 529).

microbi idrici, più abituali, e quindi più forti, si moltiplicano rapidamente ed a loro bell'agio, in proporzioni indefinite, non può realizzare le condizioni che si svolgono nell'ambiente idrico, ove, solamente per il fatto della semplice diluzione e del movimento, le proporzioni del contenuto microbico si mantengono *caeteris paribus*, quasi costanti.

Ho creduto quindi lavoro inutile fare delle ricerche con acqua di mare naturale. Il loro risultato non avrebbe avuto alcun valore pratico. Ho preferito quindi, ed ho trovato più comodo nello stesso tempo, saggiare il comportamento del *b. icteroide* nell'acqua di mare sterilizzata al calore, o filtrata con candela Chamberland, considerandola perciò solo dal punto di vista nutritivo.

Le acque studiate furono: quello del Rio della Plata, attinta nel porto di Montevideo, e quella del mare, attinta nel porto di Rio de Janeiro. La differenza di composizione chimica fra le due acque è, come si capisce, notevole.

L'acqua del Rio della Plata, presso Montevideo, risulta di una mescolanza d'acqua dolce e d'acqua salata. Infatti, mentre l'acqua del mare attinta a Rio de Janeiro contiene il 29.25 $^0/_{00}$ di Na Cl, quella del Rio della Plata, al tempo in cui cominciarono le mie esperienze, ne conteneva il 5.67 $^0/_{00}$. Dico che tale era il contenuto salino al tempo delle mie esperienze, perchè la composizione chimica delle acque del Rio della Plata è sommamente variabile e dipende dal maggiore o minor grado di diluzione ch'esse subiscono con quelle del mare, in conseguenza delle maree, delle correnti e di molte altre cause che è inutile ricordare qui.

L'acqua del porto di Montevideo non è molto ricca in microbi, quantunque riceva le acque di rifiuto della intiera città: ne contiene soltanto un *minimo* di 200 ed un *massimo* di 720 per cmc. La filtrazione le fa perdere una piccola parte di cloruro sodico (il 0.74 $^0/_{00}$). In quest'acqua del Rio della Plata, *sterilizzata*, il *bac. icteroide* era tuttora vivente dopo 90 giorni, quando interruppi ogni ulteriore osservazione. In quella *filtrata*, ripartita in 3 matracci, ottenni il seguente risultato: il matraccio n. 1 risultò sterile dopo 37 giorni, il n. 2 risultò sterile dopo 78 giorni, il n. 3 dopo 71 giorni.

L'acqua del porto di Rio de Janeiro, che avanti la filtrazione contiene il 29.25 $^0/_{00}$ di Na Cl., dopo la filtrazione ne contiene solo il 25.74 $^0/_{00}$. Il *b. icteroide* può vivere in entrambi le qualità d'acqua

durante molto tempo. Le mie ricerche ve lo dimostrarono costantemente sino al 50° giorno.

Questa notevole vitalità dal *b. icteroide* nell'acqua di mare, considerando ben inteso quest'ultima come un mezzo affatto passivo, deve prendersi in seria considerazione in tutte le questioni d'igiene pubblica nelle quali l'acqua di mare debba entrare sotto un titolo qualunque.

IX.

Riassunto generale sul processo morboso e sulla epidemiologia della febbre gialla.

I risultati di questa seconda parte completano e confermano in un modo definitivo, tutto quanto abbiamo esposto nella precedente, a proposito della etiologia e della patogenia della febbre gialla.

Il valore di questi risultati è basato soprattutto su ciò, che inoculando nei vari animali i prodotti tossici del *bac. icteroide*, si ottengono i medesimi sintomi e le medesime lesioni anatomiche che abbiamo precedentemente descritte, come dovute all' impiego dei microbi viventi.

Ciò dimostra una volta di più che il quadro morboso della malattia, così nell'uomo come negli animali, è dovuto ad un processo prevalentemente tossico, prodotto dalle sostanze attive fabbricate dal *bac. icteroide* ed al cui insieme abbiamo posto il nome di *veleno amarilligeno*.

Il *veleno amarilligeno* ha un'azione poco marcata e poco caratteristica in quegli animali che anche di fronte al virus vivente, si mostrano dotati di una reazione poco specifica: tali sono i piccoli roditori.

Allorquando però esso si inocula nell' organismo dell' animale reattivo per eccellenza, cioè nel *cane*, si provocano tutti i sintomi e tutte le lesioni anatomiche che abbiamo già segnalato dopo l' impiego del *virus* e sulla cui identificazione coi reperti clinici ed anatomici della infezione icteroide umana non v' ha più bisogno di insistere.

L' intossicazione amarilligena del cane, oltre al riprodurre la sintomatologia e le lesioni specifiche della febbre gialla, determina

la insufficienza renale e favorisce la comparsa delle caratteristiche infezioni secondarie, per parte delle ben note specie microbiche (*streptococco*, *stafilococco*, *colibacillo*), completando in tal guisa, anche coi reperti chimici e bacteriologici, la riproduzione esatta di tutto quanto abbiamo segnalato nella febbre gialla dell'uomo (1).

Lo studio della intossicazione amarilligena nella *capra* ha posto in evidenza, in una maniera veramente stupenda, l'energico potere emolitico del veleno icteroide, dandoci infine una spiegazione plausibile di quelle suffusioni bluastre, ardesiache o rosso-brune, che si rimarcano con tanta frequenza nel cellulare sottocutaneo degli ammalati e dei cadaveri di febbre gialla.

È assai probabile, specialmente nei casi in cui non si riesce ad ottenere la reazione dei pigmenti biliari nel sangue e nell'urina, che la caratteristica pigmentazione giallo-paglia della cute, la quale si manifesta dopo la scomparsa delle suffusioni suddette e molto spesso varie ore dopo la morte, sia dovuta semplicemente ad un ulteriore processo di ossidazione della sostanza colorante del sangue rimasta ad impregnare i tessuti. Si tratterebbe in questi casi, di un *ittero ematico* o meglio *emoglobinico*, come quello che si osserva molto comunemente nei casi di esagerata distruzione globulare, accompagnata da insufficienza epatica (avvelenamenti per ossido di carbonio, per idrogeno arsenicale, acetilfenilidrazina etc.).

La nefrite e la conseguente intossicazione uremica nella intossicazione icteroide della capra, non fa altro che confermare l'azione specifica di questo veleno sul parenchima renale, che dopo il parenchima epatico trovasi sempre più gravemente colpito.

La estrema sensibilità dimostrata dall'*asino* verso la toxina specifica, ci ha consentito di assistere alla manifestazione di tre importanti fenomeni; due di essi, l'ematuria e le infezioni secondarie sono

---

(1) Alcune esperienze eseguite durante la redazione della presente memoria, mi hanno rivelato un metodo, altrettanto semplice che sicuro, per determinare nei cani, una rapida ed intensa degenerazione grassa del fegato. Questo metodo consiste nell'iniettare, attraverso alle pareti addominali, direttamente nel tessuto epatico, una porzione di cultura su gelosio diluita in qualche cmc. di brodo. Uccidendo l'animale dopo 3-4 giorni, si trova la maggior parte del fegato in preda ad una steatosi simile a quella fosforica. I preparati microscopici a fresco, trattati o no con acido osmico, mostrano una vera mescolanza di grosse gocce di grasso e di cellule epatiche completamente degenerate.

abbastanza noti e frequenti, ma l'altro: la *mastorragia*, non fu per anco descritto da nessun autore e rappresenta indubbiamente la più alta manifestazione delle proprietà emorragipare dell'amarillismo.

In quanto alle esperienze sui *cavalli* può dirsi che per ora esse non hanno fatto altro che dimostrare la estrema sensibilità di questi animali verso la toxina icteroide, soprattutto allorquando essa viene inoculata per via sottocutanea.

Ma ciò che deve fermare in special modo la nostra attenzione e che rappresenta indubbiamente la parte più interessante di tutte queste ricerche sul veleno amarilligeno, è la sua esperimentazione nell'organismo umano. Sono bastate poche, ma ben riuscite esperienze, per illuminare di una luce veramente imprevista, tutto il meccanismo patogenico così oscuro e così male interpretato sin'ora del tifo icteroide. Riassumere le conclusioni di tali esperienze, sarebbe lo stesso che riprodurre ciò che abbiamo già esposto succintamente più sopra, sarebbe lo stesso che commentare il quadro di patologia tropicale, che abbiamo tracciato a grandi linee in principio della prima parte della presente memoria su questo argomento.

L'iniezione delle culture filtrate, a dosi relativamente piccole, riproduce nell'uomo la febbre gialla tipica, accompagnata da tutto il suo imponente corteggio anatomico e sintomatologico. La febbre, le congestioni, le emorragie, il vomito, la steatosi del fegato, la cefalalgia, la rachialgia, la nefrite, l'anuria, l'uremia, l'ittero, il delirio, il *collapsus*, infine tutto quel complesso di elementi sintomatici ed anatomici, che nel loro apprezzamento combinato, costituiscono la base indivisibile della diagnosi di febbre gialla, noi l' abbiamo visto svolgersi sotto ai nostri occhi, dovuto alla potente influenza del veleno amarilligeno fabbricato nelle nostre culture artificiali.

Questo fatto rappresenta non solo un brillante documento di convinzione a favore del valore specifico del *bacillo icteroide* ed un successo di prim'ordine nel campo già così ricco di successi come è quello della scienza sperimentale, ma trasporta sopra basi affatto nuove la concezione etiologica e patogenica della febbre gialla.

Eliminata di un colpo la teoria dominante che rappresentava il canale digestivo, soprattutto lo stomaco, come il *crogiuolo* dell'amarillismo, unicamente perchè i fenomeni gastro-intestinali erano quelli che più vivamente avevano colpito sin'ora i sensi del clinico; una volta dimostrato che tutti questi imponenti fenomeni ad altro non

sono dovuti che al veleno specifico fabbricato e circolante nel sangue, la febbre gialla rientra immediatamente nello stesso ordine di malattie ove io, già da tempo, ho collocato un altro grande processo morboso, che avanti le mie ricerche era stato sempre assai mal compreso: la febbre tifoide.

Tutti i fenomeni sintomatici, tutte le alterazioni funzionali, tutte le lesioni anatomiche delle febbre gialla, non sono altro che la conseguenza di un'azione eminentemente *steatogena*, *emetica* ed *emolitica* delle sostanze tossiche del *bac. icteroide.*

È forse perciò che a causa dei suoi sintomi generali, per le caratteristiche manifestazioni atasso-adinamiche, per la tendenza alle emorragie, per l'ittero etc. la febbre gialla era stata paragonata ancora all'avvelenamento per il veleno di certi serpenti!

Un altro punto di contatto fra i due processi morbosi, consiste nei fenomeni digestivi (gastro-enterite ematogena) che nei casi di avvelenamento si considera tutt'oggi erroneamente come dovuta ad una specie di *sforzo eliminatore dell'organismo.*

Per quale via il microbio specifico possa penetrare nell'organismo, onde fabbricarvi il suo veleno, ora che gli abbiamo eliminata la via d'ingresso e la sede elettiva, completamente arbitrarie, che seguendo le antiche abitudini dottrinarie gli erano state assegnate, cioè le vie digestive, è assai difficile stabilire esattamente.

Nei paesi a febbre gialla non si sono raccolti tuttavia documenti abbastanza dimostrativi per istabilirne la trasmissione idrica. Al contrario esiste una serie inesauribile di fatti, i quali deporrebbero risolutamente in favore di una trasmissione atmosferica.

L'unico esempio citato sempre dagli autori relativamente all'attenuazione della febbre gialla in Vera Cruz, dopo che la città venne fornita di buona acqua potabile, non può avere che un valore affatto relativo, come tutte le affermazioni del genere. È troppo esclusiva la tendenza a riconoscere il miglioramento sanitario verificatosi in una città, come dovuto all'effettuazione di una sola opera d'indole igienica, mentre si tratta quasi sempre d'un complesso di altri miglioramenti igienici, i quali forzatamente hanno dovuto precederla od accompagnarla.

Del resto la rimarchevole resistenza all'essiccamento ed all'ambiente idrico, manifestata dal bacillo icteroide, ci autorizza ad ammettere una diffusione del *virus* amarilligeno così per mezzo dell'aria,

come per mezzo dell' acqua. Il contagio per le vie respiratorie è inoltre dimostrato possibile dalla stessa sperimentazione negli animali.

In quanto al meccanismo del contagio per la via idrica, è un fatto ormai fuor di dubbio che l'epitelio delle vie digestive allorquando è intatto, non permette in generale il passaggio di alcuna specie di germi patogeni. Ma è da riflettersi che nei paesi a febbre gialla, i più lievi disturbi delle funzioni digestive (abuso di bibite alcooliche e ghiacciate, indigestioni, abuso di frutta etc.) soprattutto nei nuovi arrivati, costituiscono, come le cause depressive in generale, altrettante *ricette* per determinare immediatamente la entrata in iscena della terribile malattia.

Oltre a ciò non deve dimenticarsi che i primi arrivati nei paesi tropicali vanno soggetti ad un lieve processo catarrale delle vie biliari, il quale unitamente all'inevitabile *surmenage* del fegato che l'accompagna, potrebbe anche facilitare al *bac. icteroide*, penetrato, come che sia, nell'intestino, il suo attecchimento in un punto qualsiasi dell'organo epatico. Ora che conosciamo bene gli effetti formidabili del veleno amarilligeno, possiamo comprendere facilmente come il produttore di esso debba trovare senza pena soverchia, il modo di resistere e di diffondersi in qualunque organo nel quale riesca a penetrare, con o senza altre cause coadiuvanti. Nulla infatti di più facile della penetrazione del *bac. icteroide* sino all'intestino, dal momento che esso forma già parte della flora microbica delle località a febbre gialla.

L'estrema tendenza alle lesioni dell'organo epatico, rappresenterebbe dunque nei paesi caldi, non solo una delle condizioni più facilmente predisponenti all'amarillismo, ma, una volta stabilitosi questo, sarebbe la causa principale di quelle infezioni secondarie che imprimono una fisonomia, talvolta così stranamente intricata, ai reperti bacteriologici della febbre gialla e che indubbiamente contribuiscono in maniera notevole ad aumentare la mortalità spaventosa di questa malattia.

Ci siamo trattenuti abbastanza sulle origini, lo sviluppo, la durata e la fine di queste infezioni secondarie, che hanno così ostinatamente contribuito a nasconderci per tanto tempo il vero agente specifico della febbre gialla.

Lo studio sperimentale di queste infezioni secondarie, ci ha fatto assistere ad una serie di fenomeni biologici, che gettano una

luce affatto nuova sui rapporti reciproci fra l'agente dell'amarillismo e quelli dell'infezioni secondarie.

Il bacillo icteroide, sia per effetto del suo veleno specifico, sia per la grave lesione epatica che ne è la conseguenza più immediata, favorisce a un dato momento l'entrata nell'organismo ai microbi settici, i quali non solamente concludono con la malattia, molto prima di quello che potrebbe fare l'agente specifico, ma risultano poi dannosi anche a quest'ultimo, invadendone immediatamente i dominî, sopprimendone le facoltà vegetative e fors'anche la stessa vitalità.

È perciò che questi fenomeni di antagonismo microbico fra il bacillo amarilligeno e quelli delle infezioni settiche, invece di essere utili al paziente, che ne rappresenta il teatro di azione, finiscono invece con l'affrettarne la fine.

Ma esiste un altro curioso fenomeno biologico, che acquista un immenso valore nella epidemiologia della febbre gialla. Si tratta di quella strana simbiosi che abbiamo segnalato fra il *bac. icteroide* e le muffe. Queste si sono rivelate come le protettrici naturali dell'agente specifico della febbre gialla, perchè è solamente mercè il loro intervento che quest'ultimo può trovare la forza di vivere e di moltiplicarsi, laddove l'improprietà del mezzo nutritivo o l'azione sfavorevole di temperature disgenesiche, gli renderebbero affatto impossibile l'esistenza.

L'intervento di questo fattore, in apparenza così insignificante, costituisce forse la causa principale dell'acclimatamento della febbre gialla, in certe località ove pare trovi condizioni straordinariamente propizie al suo triste dominio. Sappiamo infatti che una delle condizioni considerate come indispensabili allo sviluppo della febbre gialla, cioè l'umidità, rappresenta, insieme al calore, l'elemento più propizio allo sviluppo delle muffe. È sopratutto al difetto di ventilazione ed all'eccessivo stato igrometrico dell'atmosfera, che si ritiene dovuta la insalubrità di Rio Janeiro.

Durante la grande epidemia di febbre gialla di Montevideo del 1872, erano colpiti con una preferenza inesplicabile solamente gli abitanti di case orientate verso il lato nord della città. Ora, tanto le case come il lato delle vie orientate verso il nord, si distinguono infatti a Montevideo per la loro umidità veramente eccezionale.

È quindi probabile che il fattore umidità, sia a bordo dei na-

vigli, come sulle coste e nell'interno dei paesi rappresenti il coefficiente principale di un fenomeno biologico, anzichè quell'influenza meteorologica banale, il cui ufficio trovasi sempre identico nella etiologia di quasi tutte le malattie epidemiche.

D'altro canto, la notevole resistenza presentata dal *bac. icteroide* verso il fattore principale della disinfezione naturale, vale a dire verso l'essiccamento, e la sua grande longevità nell'acqua di mare, spiegano a sufficienza il facile acclimatamento del tifo icteroide e la sua ostinata persistenza, soprattutto nelle località marittime funestate dall'avvenuta immigrazione del suo agente specifico.

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE.

Tavola X.

Alterazioni degenerative del fegato e dei reni, nell'avvelenamento icteroide e nell'avvelenamento fosforico.

Fig. 1. — Fegato della capra n° 2, morta in 18 giorni, in seguito alle iniezioni di 17 cmc. di toxina icteroide (750 diam. Zeiss. Occ. c. 6. Obb. a. 2, 0 mm).

Fissamento in liquido di Flemming e colorazione con safranina-acido picrico.

Fig. 2. — Rene della medesima capra (stesso ingrandimento e stessa preparazione).

Fig. 3. — Rene di cane morto in 2 giorni per avvelenamento fosforico (stesso ingrandimento e stessa preparazione).

Fig. 4. — Fegato del medesimo cane (idem).

Fig. 5. — Succo epatico di N. Q. (vedi Osserv. IV) trattato con toxina icteroide, estratto il giorno 14 novembre mediante una puntura esplorativa, e conservato per 12 ore in una preparazione con acido osmico (stesso ingrandimento).

Tavola XI.

Tracciati termografici della febbre gialla umana naturale e sperimentale.

Fig. 1. — Curva febbrile di E. N. (vedi Osserv. III).

Fig. 2. — Curva febbrile schematica di un caso mortale di febbre gialla. (Secondo i dottori F. Fajardo e C. Seidl di Rio Janeiro).

Fig. 3. — Curva febbrile di N. Q. (vedi Osserv. IV).

Fig. 4. — Curva febbrile di un caso di febbre gialla a decorso molto rapido (secondo il Dr. Naegeli di Rio Janeiro).

Fig. 5. — Curva febbrile di P. B. (vedi Osserv. V).

Tavola XII.

Fig. 1. — Streptococchi coltivati in una vecchia cultura di *bacillo icteroide*. Si osservano gli streptococchi sviluppati in lunghissime catene attortigliate alle caratteristiche forme involutive del *bacillo icteroide*.

Fig. 2. — Lo stesso streptococco coltivato in cultura pura in brodo-lactosato.

Fig. 3. — Una placca di gelatina nella quale si manifesta nettamente l'azione favoreggiante delle muffe, sullo sviluppo delle colonie icteroidi. Sulla cultura di gelatina, nella quale era stata seminata da varie settimane, ma senza resultato, un'abbondante quantità di bacilli icteroidi, sono cadute dall'atmosfera varie muffe, attorno alle quali hanno cominciato ad apparire in gran numero le colonie icteroidi.

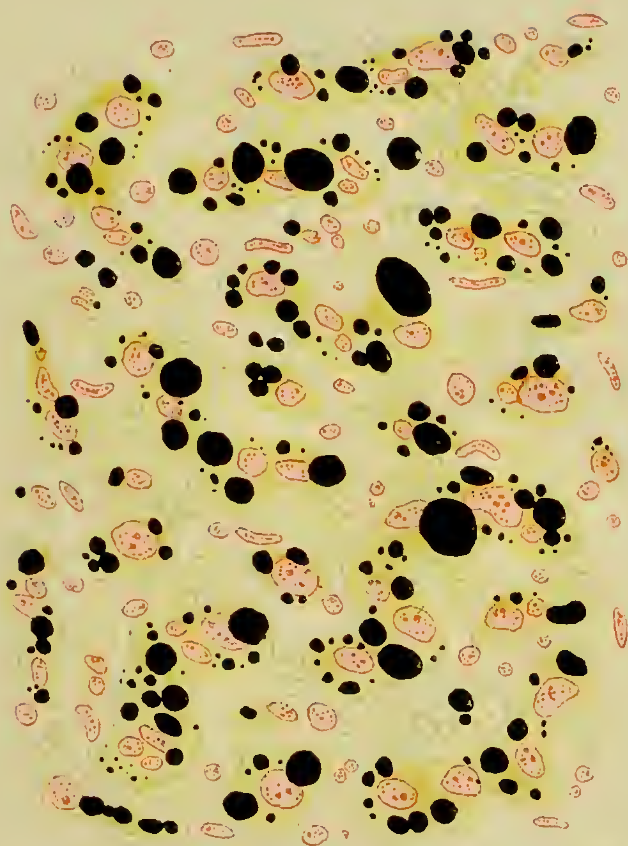


Fig. 1



Fig. 2

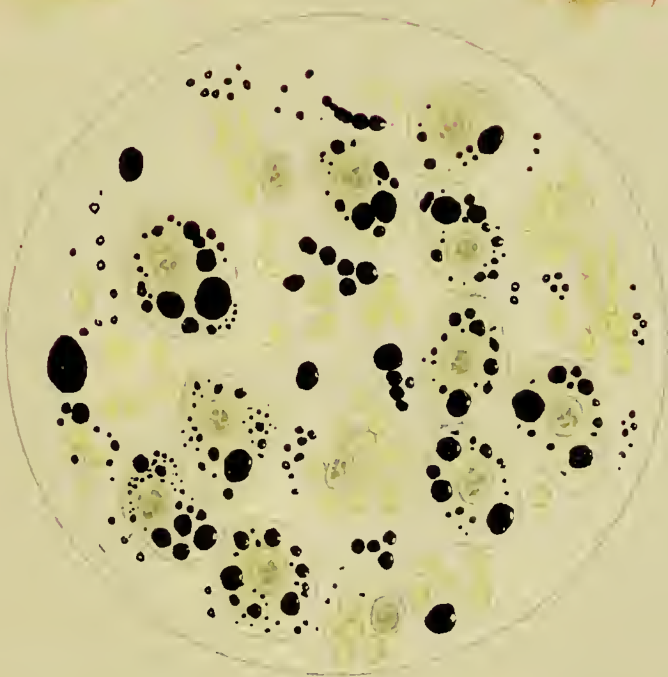


Fig. 5



Fig. 3

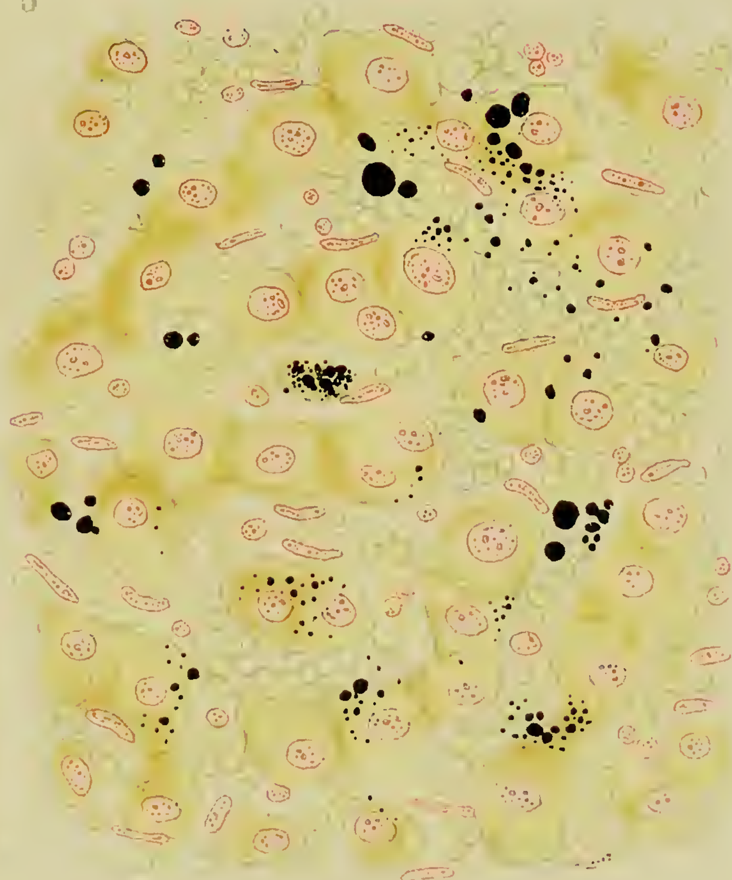


Fig. 4

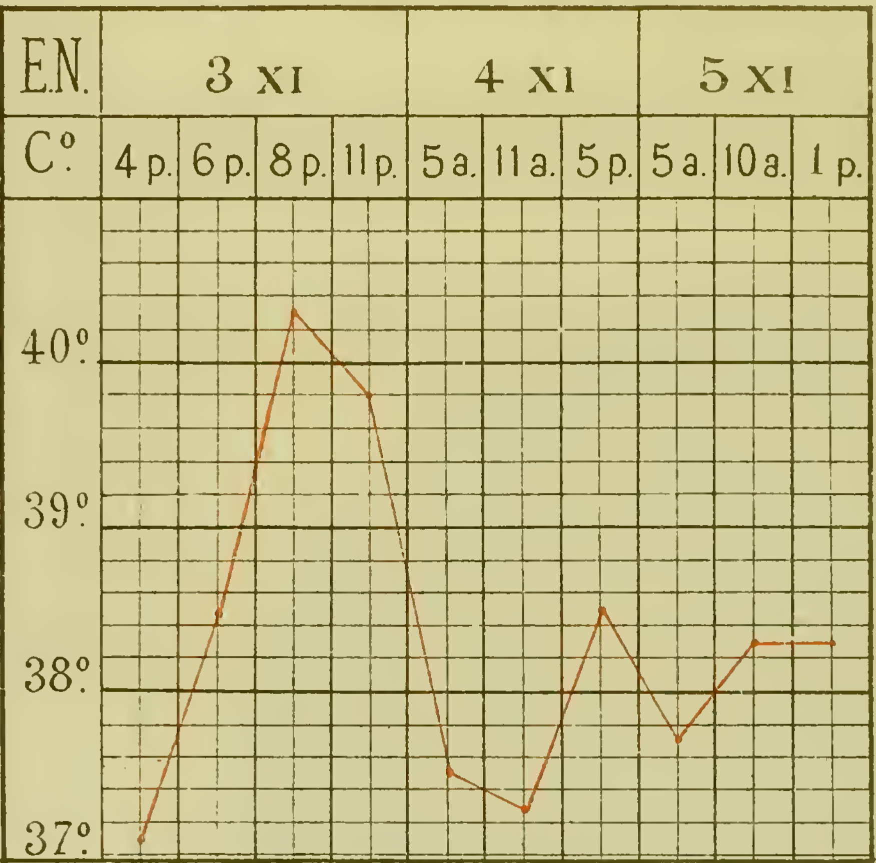


Fig. 1 *Curva febbrile di E. N. (Oss. III)*

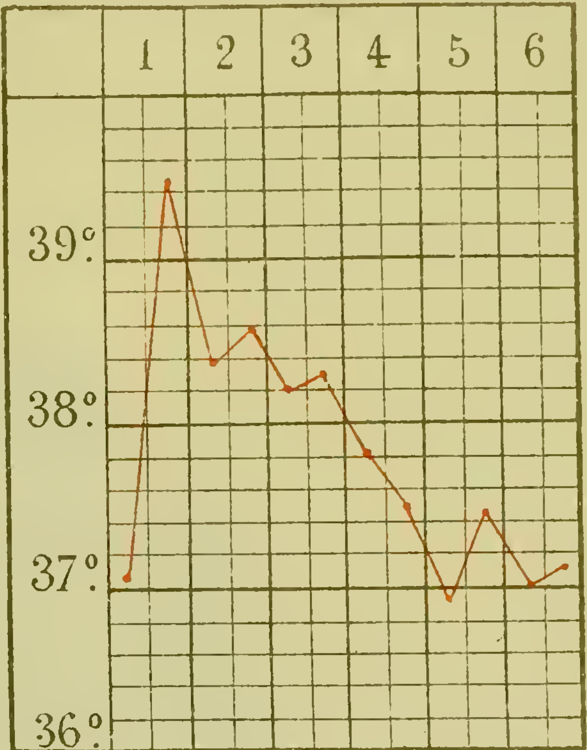


Fig. 2 *Curva febbrile schematica di un caso mortale di febbre gialla (Secondo i Dri. F. Fajardo e C. Seidl di Rio de Janeiro)*

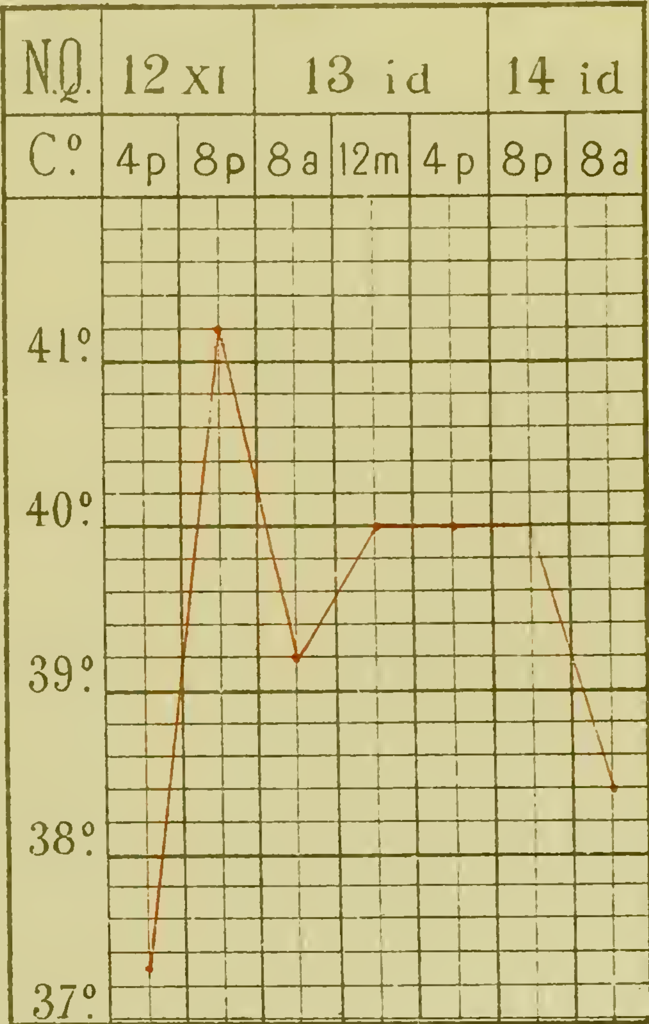


Fig. 3 *Curva febbrile di N. Q. (Oss. IV)*

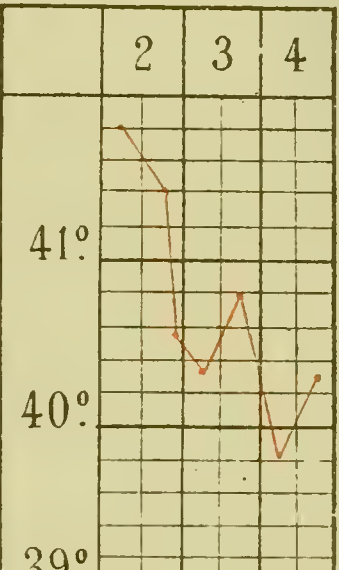


Fig. 4 *Curva febbrile di un caso mortale di febbre gialla a decorso molto rapido. (Secondo il Dr. Naegeli di Rio de Janeiro).*

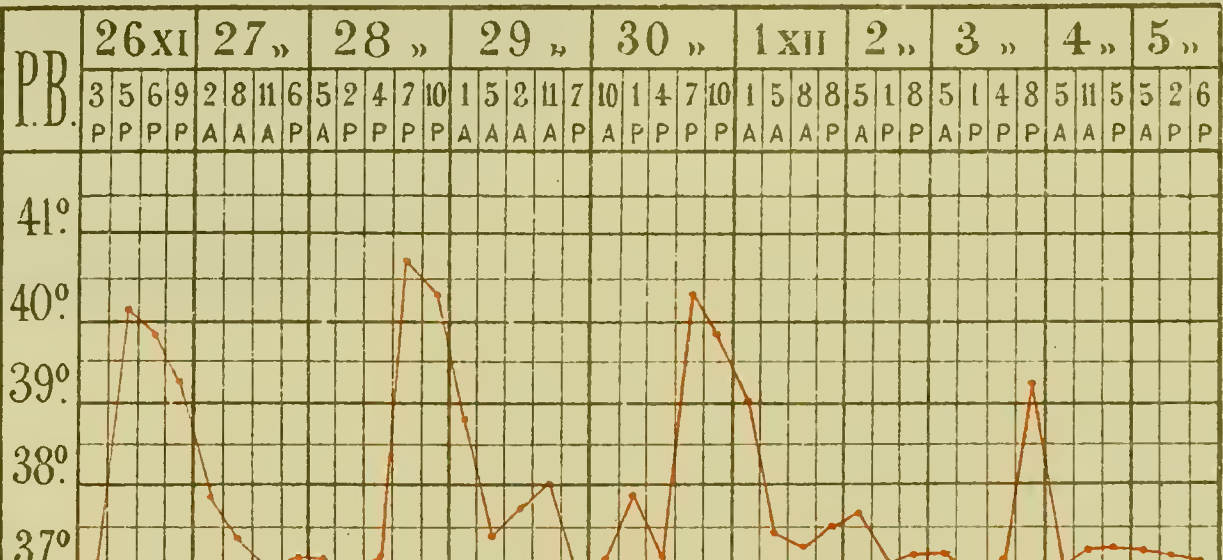


Fig. 5 *Curva febbrile di P. B. (Oss. V)*



Fig. 1

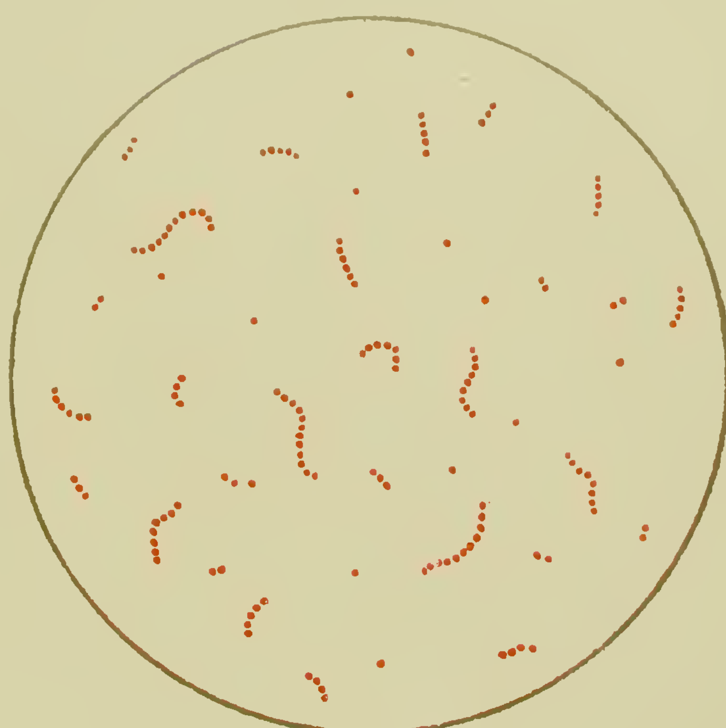


Fig. 2

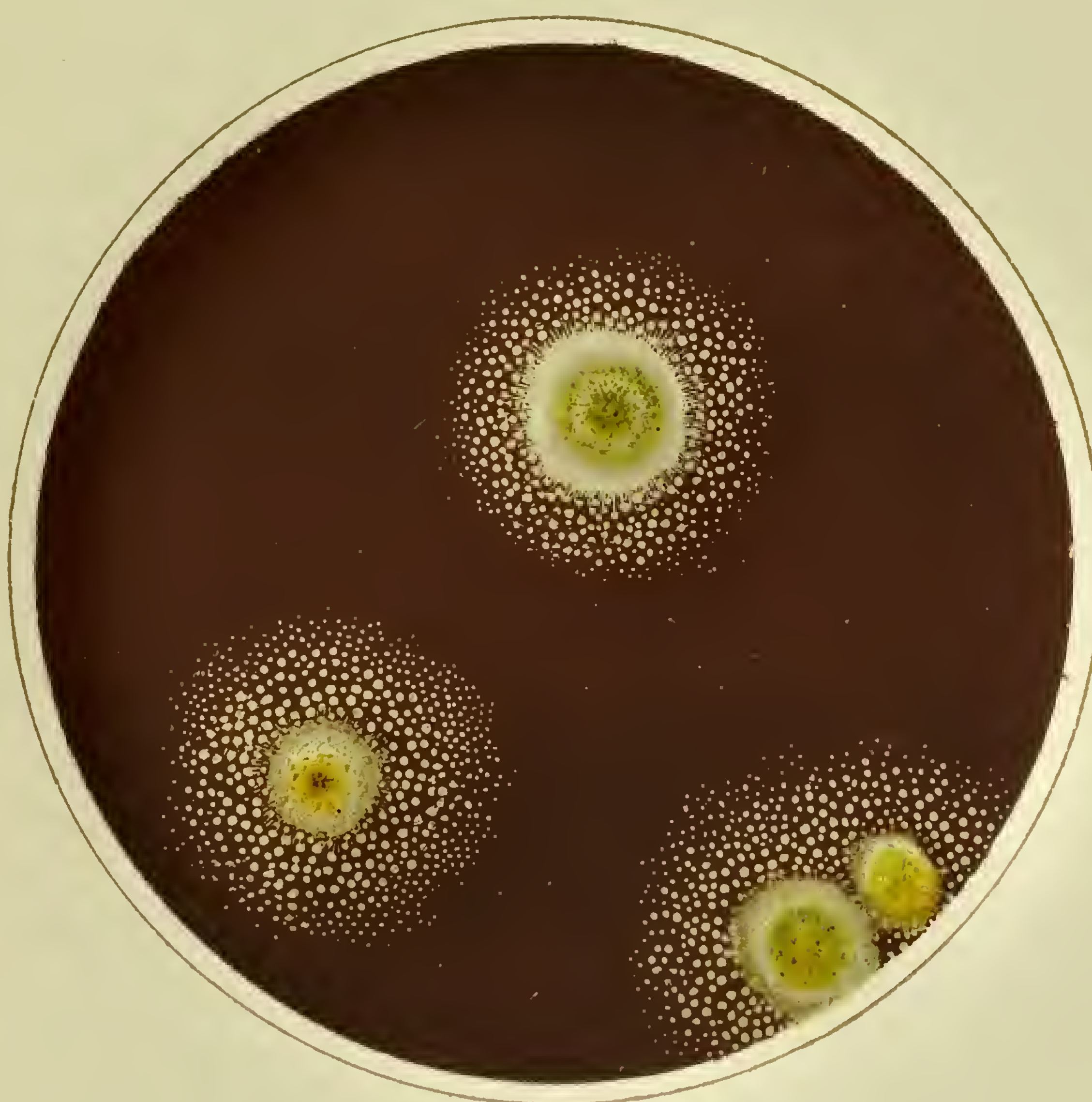


Fig. 3



PARTE TERZA.

I.

Il siero dei cadaveri e dei convalescenti di febbre gialla.

L'interesse che presenta lo studio biologico del siero del sangue, nelle malattie infettive, si riflette non solo sui rapporti che esso può presentare con le questioni riguardanti la dottrina della immunità, ma ancora sul sussidio diagnostico che esso è destinato a prestare nella pratica medica.

Ho rivolto perciò la mia attenzione anche a questa parte de' miei studî intorno alla febbre gialla, approfittando sempre dell'abbondante materiale raccolto al Lazzaretto dell'Isola di Flores e all'ospedale S. Sebastiano di Rio Janeiro.

Siero del cadavere.

Siccome la maggior parte delle mie autopsie era eseguita immediatamente o poco tempo dopo la morte, così il sangue del cuore trovavasi spesso non ancora coagulato e perciò in condizioni le più opportune per essere aspirato nelle pipette in quantità abbondante.

Avvenuta in queste ultime la coagulazione, era facile estrarne

il siero introducendovi la estremità di una pipetta sterilizzata attraverso al tappo di cotone.

Il siero che si ottiene in tal guisa non presenta sempre un identico aspetto. Talvolta è trasparente e chiaro come il siero normale, tal'altra è rossiccio per l'emoglobina disciolta, o lievemente giallognolo per la presenza di pigmenti. Spesso ho osservato il il siero giallognolo divenire di un color verde oliva, dopo un giorno di esposizione alla luce. Questo fatto depone indubbiamente a favore della presenza di biliverdina.

In altri casi infine la coagulazione si effettua in blocco senza separazione del siero o non si verifica affatto, rimanendo il sangue completamente e costantemente fluido nell'interno delle pipette.

Il siero del sangue dei cadaveri produce nettamente, nelle culture *in vitro* del bacillo icteroide, il fenomeno di Gruber-Durham; ma la intensità della reazione è assai variabile.

Inoculato negli animali, non manifesta alcun potere preventivo rispetto al bacillo specifico.

Il siero (trasudato) ottenuto puro dalla cavità pericardica ha sempre un potere agglutinante molto minore di quello presentato dal siero ottenuto per coagulazione del sangue e talvolta manca affatto.

Siero di convalescente.

Ho potuto ottenere una buona quantità di questo siero praticando un abbondante salasso a un convalescente dell'Ospedale di S. Sebastiano di Rio Janeiro.

Quest'uomo, certo Manuel Sol, spagnuolo di 40 anni, entrato all'ospedale il 7 giugno già ammalato da 4 giorni, era guarito il 9 successivo, dopo 7 giorni di malattia caratterizzata da abbondante *vomito negro*.

Il giorno 20 conservava ancora un colore itterico generale assai marcato. Un salasso di circa 150 cm. c. di sangue permise di ricavare dopo 24 ore, una buona quantità di siero color verde smeraldo, limpido e trasparente.

Questo siero produsse la reazione di Gruber-Durham con grande lentezza, ma manifestò una debole azione preventiva negli animali rispetto al bacillo icteroide.

L'iniezione simultanea del siero e del virus non riesciva a sal-

vare le cavie dalla morte, ma questa si evitava nella maggior parte dei casi, sè la iniezione del siero era praticata 24 ore avanti il virus e alla dose di almeno 2 cm. c,

In questo siero il bacillo icteroide trovava difficoltà a moltiplicarsi, ma vi rimaneva in vita per molto tempo.

Dirò una volta per sempre, che ho sperimentato sul bacillo icteroide il siero umano ottenuto da vari individui normali o convalescenti di altre malattie e che esso non ha manifestato mai negli animali, neppure a grandissime dosi, la benchè minima azione preventiva o curativa.

Rispetto però al fenomeno di GRUBER-DURHAM debbo segnalare le osservazioni seguenti:

Il *siero antidifterico* preparato nel mio Istituto produce l'agglutinamento del bacillo icteroide con grande rapidità; il *siero antitifico* produce lo stesso fenomeno in una maniera parziale; il *siero anticolico* non lo produce, come non lo produce il siero normale dell'uomo e di vari altri animali.

II.

L'immunizzazione degli animali contro la febbre gialla sperimentale.

Siccome la febbre gialla umana, dopo avvenuta la guarigione lascia il paziente, almeno per un certo tempo, ben vaccinato contro un successivo attacco, così è naturale supporre che anche negli animali sia possibile ottenere artificialmente lo stato vaccinale.

Dopo vari tentativi praticati ricorrendo all'impiego di tutti i principali metodi d'immunizzazione applicati sin'ora, ho dovuto abbandonare del tutto i conigli, a causa della loro eccessiva sensibilità. Questi animali possono infatti tollerare a lungo la iniezione di dosi relativamente grandi di culture filtrate o sterilizzate con etere o con formöl (il calore di 100° c. altera alquanto le proprietà della toxina amarilligena), ma soccombono invariabilmente alla iniezione consecutiva del virus vivente, anche a dose minima.

Per ragioni presso a poco analoghe, ho dovuto successivamente abbandonare le capre ed i montoni. Infatti questi animali, oltre ad essere straordinariamente recettivi all'azione del virus, presentano una sensibilità così esagerata del fegato e del rene, percui con somma facilità, durante il trattamento, si manifesta la nefrite accompagnata dalla insufficienza renale e della degenerazione adiposa del fegato. Le mie esperienze di immunizzazione si sono perciò limitate alle cavie, ai cani ed ai cavalli.

a) Vaccinazione delle cavie.

All'opposto di quanto si verifica per certe altre malattie, nelle quali la cavia rappresenta l'animale di scelta per ottenere una rapida e solida immunità, la sua vaccinazione contro la febbre gialla costituisce un lavoro oltremodo difficile e prolisso.

Il metodo migliore, e che risparmia sopratutto una gran perdita di animali, si è quello di impiegare dapprima e per il corso di varie settimane, sia delle piccole dosi di colture filtrate, sia degli essudati pleurici e peritoneali di capra morta per intossicazione amarilla e conservati sterili mediante alcune gocce di aldeide formica. Dopo circa un mese di questo trattamento, tenendo conto diariamente del peso dell'animale, si arriva ad ottenere una certa accostumanza generale alla toxina icteroide e quindi, trascorsi alcuni giorni dalla ultima iniezione, può praticarsi l'innesto di una piccola quantità di virus (0.1 cm. c.) che tuttavia, come resulta dalle mie precedenti ricerche, deve considerarsi come quasi sicuramente mortale.

Una volta compiuta la 1ª inoculazione del virus, è necessario attendere per lo meno 20 o 30 giorni, giacchè sino dopo trascorso tale periodo, deve considerarsi sempre l'animale come tuttavia in condizioni di morire da un giorno all'altro.

Avendo però cura di seguire attentamente le oscillazioni presentate dal peso del corpo dell'animale, che nei primi giorni di solito diminuisce notevolmente, si può giungere a farsi un criterio quasi sicuro dello scampato pericolo, allorquando si constata che il peso del corpo è ritornato a quello primitivo.

Una volta superata definitivamente la prima inoculazione del virus, essa può venir ripetuta immediatamente con una dose di coltura un po' più elevata (0.5 cm. c.).

Procedendo in tal guisa e ponendo sopratutto la massima at-

tenzione alle diminuzioni del peso del corpo, ci si può sempre regolare, sia circa la opportunità di una successiva iniezione, sia a riguardo della sua dose.

Come misura fondamentale, deve evitarsi assolutamente la nuova inoculazione del virus avanti che l'animale non abbia ricuperato del tutto il suo peso primitivo.

Anche malgrado ciò la mortalità prodotta dalla vaccinazione, per quanto lenta e ben condotta, è assai rilevante nelle cavie.

Infatti solamente dopo 6 o 7 mesi può ritenersi una cavia ben vaccinata contro il bacillo della febbre gialla.

Attualmente posseggo infatti molte cavie le quali han ricevuto già per molte volte consecutive la iniezione sottocutanea di 2 cm. c. di coltura virulenta: dose che uccide infallibilmente in 7 od 8 giorni.

È poi da osservare che malgrado una così solida vaccinazione contro il virus, le cavie rimangono tuttavia molto sensibili alle sue toxine, per cui allorquando si giunge ad iniettare in una sola volta la forte quantità di 2 cm. c., devesi sempre aspettare almeno un mese, avanti di ripeterla.

In queste come in tutte le vaccinazioni degli animali contro la febbre gialla è certo applicabile più che in tutte le altre malattie sperimentali conosciute sin qui, la seguente avvertenza: *procedendo con somma lentezza si risparmia tempo!*

Riflettendo infatti che una buona vaccinazione delle cavie contro il cholera, la febbre tifoide, ecc., non richiede più di 2 o 3 mesi, resulta evidente la difficoltà di una vaccinazione contro la febbre gialla che richiede, come abbiamo visto, almeno 6 o 7 mesi di trattamento assiduo e delicato.

b) Vaccinazione dei cani.

Il cane può immunizzarsi contro la dose minima mortale del *bacillo icteroide* molto più presto che non le cavie.

Infatti dopo una serie di iniezioni dapprima sottocutanee e poscia endovenose di colture dapprima filtrate e poscia semplicemente sterilizzate all'etere, per la durata di circa due mesi, a intervalli relativamente brevi, si può procedere alla iniezione del virus.

Questo che è sempre rappresentato da colture in brodo fresche di 24 ore, deve iniettarsi da principio nel tessuto sottocutaneo.

Malgrado che in seguito a ciò, come ho segnalato in altra oc-

casione, si determinino sempre delle estese infiltrazioni che possono terminare in abbondanti raccolte purulente, tuttavia considero questo trattamento previo come indispensabile, avanti di passare alle iniezioni endovenose.

Queste iniezioni endovenose possono praticarsi per una qualunque delle numerose vene superficiali del corpo. È bene infatti evitare, per quanto è possibile, le vene del collo, dovendo esse servire ai salassi successivi.

Di solito, allorquando si cominciano a praticare le iniezioni endovenose, i cani si mostrano straordinariamente sensibili. Il vomito soprattutto si manifesta quasi senza eccezione, e le prime volte gli animali rimangono abbattuti e febbricitanti durante vari giorni. Però a poco a poco l'accostumanza a dosi sempre più elevate di colture virulenti, si stabilisce sempre meglio, e il cane finisce col ricevere, a capo di 7-8 mesi, delle quantità molte volte mortali di virus amarilligeno.

È necessario però rilevare il fatto che, malgrado la innegabile tolleranza pel virus, i cani anche se solidamente vaccinati, non si accostumano mai del tutto alle dosi multiple di toxina; infatti subito dopo le iniezioni endovenose, in special modo allorquando esse son praticate con colture in brodo, si provoca sempre il vomito e l'animale rimane per alcune ore molto abbattuto. È perciò molto più utile, quantunque meno comodo, di sostituire le colture in brodo con colture su gelosio diluite in acqua sterilizzata.

c) *Vaccinazione dei cavalli.*

È chiaro che volendo utilizzare le proprietà preventive e curative del siero degli animali vaccinati nella profilassi e nel trattamento della febbre gialla umana, bisogna ricorrere agli animali di grossa taglia.

Il bue ed il cavallo si presentano quindi in prima linea.

Il bue ha sul cavallo un notevole vantaggio: vale a dire che tollera le iniezioni sottocutanee delle colture icteroidi senza presentar mai quelle enormi tumefazioni, accompagnate da lunghissime reazioni febbrili e seguite dalla ulcerazione della parte, che nei cavalli costituiscono la regola e impediscono assolutamente la vaccinazione per via sottocutanea. Tuttavia, a parte le difficoltà tecniche molto maggiori, il bue presenta lo svantaggio di non poter tolle-

rare senza gravissimi inconvenienti le iniezioni endovenose delle toxine e del virus sterilizzato.

In generale queste iniezioni endovenose sono mal tollerate anche dal cavallo e richiedono tale un complesso di precauzioni, che solamente una lunga pratica e l'insegnamento acquisito dopo vari accidenti, possono mettere al riparo da sgradevoli sorprese.

Nella vaccinazione del cavallo contro la febbre gialla si procede nella seguente maniera.

Dopo avere scelto un buon animale, giovane e di razza meticcia (i cavalli creoli sono assolutamente da rifiutarsi perchè troppo sensibili all'azione delle toxine), lo si sottopone dapprima ad iniezioni sottocutanee di piccole dosi (5-10 cm. c.) di colture filtrate.

Queste iniezioni sono seguite regolarmente da elevazioni febbrili che sul principio presentano talvolta la durata di vari giorni. Trascorso questo primo periodo, che potrebbe considerarsi quasi come un periodo preparatorio, deve abbandonarsi immediatamente l'uso delle iniezioni sottocutanee, perchè oltre al determinare la febbre quasi continua e delle ulcerazioni di difficile guarigione, provocano un dimagramento notevole dell'animale.

Le iniezioni endovenose (nella giugulare esterna) vengono cominciate con piccole dosi di colture filtrate, che in genere sono ben tollerate, non provocando altro che una lieve ascensione della temperatura per la durata di poche ore.

Però non appena si comincia ad aumentare la dose, od alle colture semplicemente filtrate si sostituiscono quelle sterilizzate con etere, le quali sono molto più attive, l'animale dà segni di un malessere così grave, che molte volte pone in serio pericolo la sua vita.

Di solito, subito dopo ciascuna iniezione, il cavallo risente l'azione generale del veleno amarilligeno. Si regge appena sulle zampe, è invaso da tremore generale ed infine è obbligato a gittarsi al suolo in preda ad accessi dispnoici che spesso assumono una imponenza straordinaria e talvolta possono provocare la morte.

Trascorso questo primo periodo di profondo malessere, si manifesta invariabilmente la febbre, che dura circa 12 ore ed è accompagnata da disappetenza, tristezza e debolezza generale.

È per causa di ciò che le iniezioni non possono ripetersi se non a lunghi intervalli e a seconda lo permetta volta per volta lo stato dell'animale.

Un'altra osservazione di grande importanza è necessario di fare riguardo alla tecnica della vaccinazione dei cavalli.

Deve evitarsi cioè nel modo il più assoluto di praticare l'iniezione fuori della vena.

In tal caso si provocano infatti degli edemi estesi e profondi ai lati del collo, percui è resa impossibile per qualche settimana ogni ulteriore iniezione intravenosa; questi edemi oltre a risvegliare uno stato febbrile oltremodo dannoso, finiscono col propagarsi nelle parti declivi del petto, invadendo talvolta i membri anteriori e ponendo quindi il cavallo nella impossibilità di muoversi e fare qualsiasi esercizio necessario.

Dopo circa due mesi di trattamento per mezzo delle colture filtrate, si possono impiegare le colture semplicemente sterilizzate con etere e solamente dopo 5 o 6 mesi dal principio del trattamento deve avventurarsi la prima iniezione di una piccola dose di coltura vivente.

Questa prima iniezione determina infatti una reazione generale che è caratterizzata soprattutto dalla disappetenza, dal dimagramento e dalla febbre che dura per circa 8-12 giorni.

Trascorso questo periodo si può ripetere la iniezione del virus impiegando a poco a poco dai 5 ai 10 cm. c. di coltura in brodo di 24 ore.

Come vedesi, nella vaccinazione dei cavalli contro la febbre gialla, siamo ben lungi dalla facile tecnica e dai rapidi risultati che si ottengono nella vaccinazione antidifterica.

Durante la vaccinazione dei cavalli contro la febbre gialla, non mancano mai di prodursi molti altri incidenti che talvolta ne pongono in serio pericolo la esistenza. Il bacillo icteroide deve infatti considerarsi fra i più difficili e soprattutto fra i più lenti a produrre nell'organizzazione animale la comparsa delle sostanze immunizzanti.

Infatti queste sostanze cominciano appena a rilevarsi con gli esperimenti sieroterapici nelle cavie, dopo un trattamento di molti mesi, come vedremo in appresso.

III.

La sieroterapia della febbre gialla sperimentale.

Da quanto abbiamo esposto sommariamente più sopra risulta quindi che la immunizzazione degli animali contro la infezione determinata del microbo della febbre gialla, rappresenta un compito non solamente difficile ma anche di lunga durata.

Ciò spiega come solamente dopo un trattamento di molti mesi io abbia potuto arrivare ad ottenere dagli animali immunizzati, un siero dotato di proprietà preventive e curative.

Infatti queste proprietà del siero, anche allorquando l'animale può considerarsi ben vaccinato, per aver tollerato delle dosi più volte mortali del virus specifico, non dimostrano molta efficacia nelle esperienze sugli animali.

Bisogna che la vaccinazione sia protratta per molto tempo e che l'animale in trattamento abbia ricevuto delle grandi quantità di colture virulente.

Credo perciò superfluo riferire qui sui risultati ottenuti mercè l'impiego di siero ricavato da animali non ancora ben vaccinati.

Gli animali ipervaccinati e quindi in grado di fornirmi un siero attivo sono stati i seguenti:

1° *Siero di cavie vaccinate.*

Circa 30 cavie sono sopravvissute ad un trattamento che ebbe principio nell'agosto del 1896. Queste cavie avevano ricevuto rispettivamente, all'epoca in cui cominciavano a dare un buon siero preventivo e curativo (11 marzo 1897), circa 20 cm. c. di colture virulenti nello spazio di 7 mesi (1).

Il siero di questi animali inoculato sotto le cute delle cavie nuove, 24 ore avanti o 24 dopo l'iniezione di una dose di virus che può considerarsi come più volte mortale (1 cm. c.), è sufficiente a im-

---

(1) La dose di virus ordinariamente mortale per le cavie come per i conigli è di 0. 1 cm. c.

pedirne la morte, la quale si verifica, com'è noto, negli animali testimoni nello spazio di 7-8 giorni.

Questo risultato può ottenersi anche impiegando il siero alla dose di 1 cm. c.

Gli animali che dettero i primi successi sieroterapici furono 26 cavie, delle quali 20 furono trattate con siero e le rimanenti sei lasciate come testimoni. Queste ultime morirono tutte, come di consueto, entro 6-12 giorni: delle 20 cavie trattate, tre morirono fra il 10° ed il 16° giorno e le restanti 17 si rimisero del tutto, dopo un dimagramento progressivo che durò per lo spazio di 14-15 giorni.

2° *Siero di cani vaccinati.*

Attualmente furono tre cani molto ben vaccinati. Il primo di essi è lo stesso su cui venne esperimentata, per la prima volta in questi animali, l'azione patogena del microbo specifico della febbre gialla.

Infatti il 12 agosto 1896, pesando kg. 10. 200, questo cane venne inoculato nelle vene con 10 cm. c. di una coltura in brodo di 24 ore. Quantunque al seguito di questa iniezione l'animale cadesse gravemente ammalato con tutti i sintomi più imponenti della febbre gialla (vomito, albuminuria, itterizia, ecc.), tuttavia dopo circa un mese di malattia, durante la quale era arrivato a perdere sino a kg. 3.400 del proprio peso, si ristabilì del tutto, e venne riserbato alle vaccinazioni. Il 14 ottobre successivo, cioè 63 giorni dopo la prima iniezione del virus e 16 giorni dopo l'entrata in convalescenza, gli venne praticato un salasso da cui potè ottenersi una certa quantità di siero lattiginoso che dimostrò negli animali un potere preventivo assai debole.

Fu pensato quindi di rinforzare la vaccinazione mercè successive iniezioni intravenose di colture viventi sia in brodo che in gelosio.

Così il 3 marzo del 1897 questo cane, pur avendo ricevuto in tutto più di 300 cm. c. di colture virulente nello spazio di circa 8 mesi, aveva raggiunto il peso di kg. 15. Gli venne praticato perciò un salasso di circa 250 grammi di sangue, che fornì un siero dotato di un potere preventivo e curativo quasi altrettanto energico come quello dato dalle cavie ipervaccinate.

Questo siero aggiunto in minime tracce alle colture fresche in

brodo del bacillo icteroide, provoca il fenomeno di GRUBER DURHAM in pochi minuti, con la rapidità di una reazione chimica.

Il siero di questo primo cane salvava da principio (marzo 1897) circa 8 cavie su dieci, anche allorquando queste venivano inoculate con dosi multiple mortali del virus. Al giorno d'oggi (luglio 1897) la sua attività è notevolmente cresciuta, avendo ricevuto successivamente la iniezione intravenosa o peritoneale di altri 100 cm. c. di coltura in brodo e 20 colture su gelosio.

Questo siero non sembra presentare proprietà antitossiche, giacchè non impedisce un intenso dimagramento durante i primi giorni successivi alla iniezione della coltura microbica. Deve quindi ritenersi che agisca come il siero degli animali vaccinati contro il bacillo tifico, il vibrione caviario, etc., i quali, come è noto, non agiscono distruggendo le toxine, ma provocando direttamente la distruzione dei microbi mercè l'energico intervento delle cellule dell'organismo.

Gli altri due cani che al giorno d'oggi forniscono del pari un buon siero terapeutico, furono sottoposti alla vaccinazione il 1° settembre del 1896, cominciandosi dapprima con iniezioni sottocutanee di colture filtrate, poscia con colture sterilizzate con aldeide formica, e infine con colture viventi, dapprima sotto la cute e in ultimo nelle vene.

Il primo di questi cani, del peso iniziale di kg. 12,200, il giorno in cui lo sottoposi per la prima volta al salasso di 200 cm. c. di sangue (22 febbraio) pesava kg. 15 ed aveva ricevuto in circa sei mesi di trattamento: 180 cm. c. di colture filtrate, 100 cm. c. di colture sterilizzate con aldeide formica, 55 cm. c. di colture viventi sotto la cute e 360 cm. c. di colture in brodo con varie colture su gelosio nelle vene.

Il siero di questo cane manifestò allora un'azione preventiva nelle cavie alla dose di 2 cm. c. inoculati almeno 24 ore prima del virus: impiegato come mezzo curativo riusciva a salvare circa la metà degli animali iniettato alla dose di 2-3 cm. c. per due giorni consecutivi.

Al giorno d'oggi (luglio) l'attività di questo siero è notevolmente aumentata, avendo ricevuto successivamente l'animale periodiche inoculazioni di virus vivente nel peritoneo e nelle vene.

Il secondo cane del peso iniziale di kg. 18,100 allorquando venne salassato per la prima volta (1° marzo 1897) pesava kg. 19,200 ed aveva ricevuto nello stesso periodo di tempo del precedente: 460 cm. c. di colture filtrate, 120 cm. c di colture sterilizzate al formöl, 55 cm. c. di colture viventi sotto la cute e 290 cm. c. delle stesse nelle vene.

Il siero di questo secondo cane si manifestò allora assai debole: la sua azione preventiva, nelle cavie, era soltanto percettibile alla dose di 5 cm. c. iniettati in due giorni consecutivi. La sua azione curativa era quasi nulla.

Dal 1° marzo al 1° luglio quest'animale ha ricevuto successivamente e complessivamente la iniezione peritoneale di 29 colture in gelosio e di 70 cm. c. di colture in brodo, ma a cominciare dal principio di questo mese ha presentato una notevole diminuzione di peso, così che è stato rimandato il secondo salasso ad epoca più opportuna.

Da ciò si deduce quanto sia lento e difficile determinare nei cani una forte tolleranza al virus amarilligeno e quanto sia diversa la maniera di reagire in animali appartenenti alla medesima specie.

L'efficacia preventiva e curativa di questi sieri venne sempre dimostrata nelle cavie, perchè ancora non posseggo un siero così attivo da poter salvare i conigli, i quali presentano verso il bacillo icteroide una sensibilità veramente eccezionale.

3° *Siero di cavalli vaccinati.*

Siccome tutto quanto abbiamo segnalato più sopra, circa la vaccinazione dei cavalli contro il virus amarilligeno, non è altro che il frutto della osservazione personale, così ritengo superfluo abbondare in ulteriori dettagli, sul metodo da seguirsi affine di condurre a buon punto una solida vaccinazione in questi animali.

Il primo cavallo sottoposto al trattamento fu un robusto meticcio cui, il 24 luglio 1896 si cominciarono ad inoculare sotto la cute 2 cm. c. di coltura filtrata.

Al 15 settembre questo cavallo aveva ricevuto complessivamente sotto la cute 760 cm. c. di toxina filtrata e furono principiate tosto le iniezioni intravenose di colture sterilizzate con etere.

Al 21 novembre ne erano già stati inoculati 2,040 cm. c. e il

24 dello stesso mese venne praticata al cavallo la prima iniezione intravenosa di coltura vivente.

Ogni iniezione di 10-20 cm. c. era seguita regolarmente da un accesso febbrile che di solito scompariva dopo 24 ore.

Al 14 febbraio 1897, dopo aver ricevuto in tutto, nello spazio di circa 7 mesi: 760 cm. c. di colture filtrate, 2 litri e 40 cm. c. di colture sterilizzate e 240 cm. c. di colture viventi, questo cavallo morì improvvisamente, pur trovandosi in condizioni generali assolutamente ottime e senza essere stato mai salassato.

Il secondo cavallo che attualmente fornisce già un siero dotato di un buon potere preventivo nelle cavie, fu sottoposto al trattamento a principiare dal 1° ottobre 1896.

Il giorno 3 marzo 1897, in cui gli venne praticato il primo salasso di un litro di sangue, aveva ricevuto complessivamente e sempre nelle vene: 29 cm. c. di colture filtrate, 2,640 cm. c. di colture sterilizzate con etere e 35 cm. c. di colture viventi.

Il siero ottenuto mercè questo salasso, venne a lungo sperimentato nel trattamento preventivo della infezione amarilla nelle cavie, e si mostrò fornito di un'azione molto debole.

Per salvare una cavia dalla consecutiva iniezione di una dose mortale di virus amarilligeno, occorreva iniettare 24 ore innanzi, almeno 5 cm. c. di siero, cioè una dose che doveva considerarsi come veramente eccessiva.

A quell'epoca il siero di questo cavallo non era ancora in grado, come quello delle cavie e dei cani, di guarire la malattia allorquando essa era già sviluppata.

Sotto questo rapporto quindi si presentava dotato di un potere preventivo quasi identico a quello posseduto dal siero di convalescente ricordato più sopra.

Dal 3 marzo al 4 maggio si proseguì a praticare delle iniezioni di colture in brodo alla distanza di 4-5 giorni l'una dall'altra, arrivando a inoculare in una sola volta sino a 35 cm. c. di brodo-coltura.

L'accostumanza si andava frattanto manifestando rapidamente, la reazione febbrile successiva ad ogni iniezione era sempre minore e durava non più di 12 ore.

Al 10 maggio venne praticata la prima iniezione endovenosa di prima coltura su gelosio, il 17 detto di seconda coltura e il 22 e il 29 detto di terza coltura.

Quest'ultima dose fu però ritenuta eccessiva a causa della reazione febbrile e del grave malessere generale presentato dall'animale ad ogni iniezione. Per conseguenza la dose massima di ciascuna iniezione ridotta di nuovo a 2 colture su gelosio e il numero delle iniezioni stabilito a 5 per mese.

Al 31 giugno il cavallo aveva perciò ricevuto complessivamente e nello spazio di 9 mesi le seguenti quantità di toxine e di virus:

Iniezione	sottocutanea	di colture filtrate	29 cc.
Id.	id.	di colture sterilizzate	350 cc.
Id.	intravenosa	di colture sterilizzate	2,640 cc.
Id.	id.	di colture viventi	345 cc.
Id.	id.	di colture su gelosio n.	19

Al 1° luglio venne praticato un secondo salasso di 500 gr. ed il siero immediatamente saggiato nelle cavie contro la dose mortale di colture virulenti.

Questo siero conferiva l'immunità già 24 ore innanzi alla dose di 0.5 cm. c. e riusciva a salvare le cavie già ammalate anche se inoculato 48 ore dopo alla dose di 2 cm. c.

Le dosi suddette sono ancora ben lungi dal rappresentare l'ultima espressione del potere preventivo e curativo del siero antiamarilligeno, sopratutto se si tiene in conto quello posseduto da altri sieri preventivi e curativi, preparati sin'oggi da vari autori.

Però risulta altresì che ottenere una buona vaccinazione contro il bacillo della febbre gialla negli animali, è molto più difficile ed è necessario un tempo di gran lunga superiore a quello che d'ordinario s'impiega con altre specie di virus conosciute.

Questi sono i risultati ottenuti sin'ora nelle esperienze di laboratorio, circa il trattamento specifico della febbre gialla.

L'azione preventiva e curativa del siero di cavia, di cane e di cavallo, vaccinati contro il bacillo icteroide, deve considerarsi quindi come positivamente dimostrata negli animali.

Esperienze analoghe praticate con forti dosi di siero normale umano e di altri animali, come pure con siero antidifterico, antitifico, anticolerico e antivelenoso (del Dott. Calmette) non hanno dato alcun risultato nel senso di un'azione specifica contro il microbio della febbre gialla.

Molto probabilmente questo medesimo siero che salva gli animali che sono destinati a soccombere quasi senza eccezione di febbre

gialla sperimentale, potrebbe essere di utile intervento nella febbre gialla spontanea dell'uomo, la quale presentando in questi ultimi anni, specialmente a Rio de Janeiro, una percentuale di mortalità oscillante intorno al 43 per cento (1), trovasi di fatto in condizioni molto migliori per trar giovamento dall'azione curativa di un siero specifico.

Ma sarà possibile verificare questo fatto, solo allorquando la più intensiva immunizzazione del cavallo che attualmente trovasi in trattamento più inoltrato (2), potrà fornire un siero ancora più attivo e in quantità tale da poterci consentire di intraprendere esperienze di sieroterapia nell'uomo ammalato.

Montevideo, 24 luglio 1897.

---

(1) Questa percentuale è ben lungi dal presentarsi nella febbre gialla in maniera costante. Essa varia grandemente a seconda delle varie epidemie e delle località. Sono state infatti segnalate delle enormi oscillazioni: dal 13 al 96 per cento.

(2) Esistono ancora nell'Istituto: un secondo cavallo ed un bue, il cui trattamento data già da vari mesi, ma il cui siero non venne ancora saggiato negli animali.

